



**Estudio de la biodiversidad microbiana asociada con áreas
edáficas marginales para la agricultura en la Pampa Deprimida
(Buenos Aires, Argentina), bajo la influencia del monocultivo de
Lotus tenuis.**

**Análisis de la interacción entre *Lotus spp.* y *Fusarium solani* en el
continuum mutualismo-patogénesis.**

Amira Susana del Valle Nieva

Tesis para optar por el título de Doctor en Biología Molecular y
Biotecnología de la Universidad Nacional de General San Martín

Director de tesis: Dr. Oscar A. Ruiz

Codirector de tesis: Dra. Ana B. Menéndez

Lugar de trabajo: Unidad de Biotecnología 1. Instituto de
Investigaciones Biotecnológicas – Instituto Tecnológico de Chascomús.
Universidad Nacional de San Martín IIB-INTECH (CONICET/UNSAM)

Director de tesis
Dr. Oscar Adolfo Ruíz
Investigador Principal CONICET

Co-Director de tesis
Dra. Ana Bernardina Menéndez
Investigadora Principal CONICET

Agradecimientos

Al Dr. Oscar Ruiz, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis doctoral y también por brindarme las herramientas necesarias para crecer en mi carrera.

A la Dra. Ana Menéndez, por su valiosa ayuda en mi proceso de formación científica, en especial con la escritura.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la beca doctoral, con la cual pude realizar mi formación.

A la Dra. María Eugenia Llames, por su invaluable aporte a mi formación en estadística y ecología.

Al Prof. Dr. Joachim Kopka y su grupo de trabajo: Alexander Erban, Ines Fehrle y Olga Birne, por su aporte en el estudio del metabolismo primario y por su cordial atención durante mi estadía en el *Max Planck Institut für Molekulare Pflazenphysiologie* en Alemania.

A mi mamá, Amira y mi hermano Luís, quienes me brindaron siempre su apoyo en todas las decisiones de mi vida, incluidas aquellas donde la distancia nos separaría. A mis tíos, Felisa y Fernando, y mis primos Elías y Gabriel, por hacer que todos esos pequeños momentos compartidos sean tan extrañables.

A mis amigas, Ruth y Bety, quienes sin importar las distancias, me acompañaron y brindaron su apoyo sincero.

A Diana, Ailín y Juan Ignacio, con quienes compartí muchas risas, pero también me escucharon y acompañaron en mis momentos tristes.

A mis compañeros y amigos de la UB1, en especial a Pablo, Juan Manuel y Mónica, por su ayuda con las técnicas moleculares y “tormentas de ideas”. A todas las personas con las que compartí y comparto este pequeño laboratorio con grandes ideas del INTECH: Santiago “Proli”, Lucrecia, Matías R., Franco, María M., Matías B., Cristian, Francisco, Ana P., Andrés G., Andrés R., Mariana, César, Ayelén, Paula, Florencia, Vanina, Belén, Pato, Juan Pedro, Rubén.

A las personas que son mi familia, aquí en Chascomús: Dianis, Juan I., Juan Ma., Liz, Oswaldo, Luisa, Jony, Edwin, Diani, Juancho, Maxi, Sonia, Nagif, Úrsula, Lore, por todos los momentos compartidos.

A la Lic. Susana Pernasetti y a la Ing. Agr. Gabriela Di Bárbaro, quienes me formaron en las técnicas básicas de la Microbiología.

Al todo el personal del IIB-INTECH, quienes de alguna u otra manera aportaron a la realización de este trabajo de tesis.

Publicaciones derivadas de esta tesis

- **Nieva, A. S.**, Bailleres, M. A., Corriale, M. J., Llames, M. E., Menéndez, A. B., y Ruiz, O. A. (2016). *Herbicide-mediated promotion of Lotus tenuis (Waldst. y Kit. ex Wild.) did not influence soil bacterial communities, in soils of the Flooding Pampa, Argentina*. Applied Soil Ecology, 98, 83-91.
- **Amira Susana Nieva**, Matías A. Bailleres, María Eugenia Llames, Miguel Angel Taboada, Oscar A. Ruiz, Ana Menéndez. (2018). *Promotion of Lotus tenuis in the Flooding Pampa (Argentina) increases the soil fungal diversity*. Fungal Ecology. En prensa.

Presentaciones a Congresos

- **Nieva AS**, Llames ME, Bailleres MA, Menendez AB, Ruíz OA. *Pyrosequencing reveals changes in fungal soil communities under Lotus tenuis monoculture*. LII Congreso de la Sociedad Argentina en Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, 7 al 10 de Noviembre del 2016, Córdoba, Argentina.
- **Nieva, Amira Susana**; Antonelli, Cristian; Menendez, Ana; Ruiz, Oscar. *Respuesta de dos especies del género Lotus a la inoculación con una cepa de Fusarium sp. (Response of different Lotus species against inoculation with a Fusarium strain)*. XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 13 al 16 de Noviembre del 2016. Corrientes, Argentina
- **Nieva, AS**; Bailleres, MA; Llames, MA; Menendez, AB; Ruiz, OA. *Impact on the soil bacterial communities by the herbicides used by the Lotus tenuis promotion*. LI Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mar del Plata, 3 al 6 de Noviembre del 2015.
- **Nieva, AS del V.**; Menendez, AB; Ruiz, OA. *Comportamiento diferencial especie-específico de un endófito fungico del género Lotus*. III Congreso Argentino de Microbiología Ambiental y Agrícola (CAMAYA). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 25 al 27 de Noviembre del 2015.

- **Nieva, Amira Susana del Valle;** Menendez, Ana Bernardina; Ruiz, Oscar Adolfo. *Evaluación de la tolerancia al estrés salino y alcalino de hongos endofíticos de Lotus spp. y su posible utilización como solubilizadores de fósforo en la Pampa Deprimida.* XV Congreso Latinoamericano- XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata, Argentina, 21 al 24 de Septiembre del 2014.

Presentaciones a Reuniones Científicas

- **Nieva, A. S.,** Llamas, M.E., Bailleres, M.A., Menendez, A.B., Ruiz, O.A. *Efecto diferencial de la promoción de Lotus tenuis sobre la estructura de las comunidades de bacterias y hongos de los suelos de la Pampa Deprimida.* V Jornadas Bonaerenses de Microbiología del Suelos para una Agricultura Sustentable. 30 de Junio y 1 de Julio de 2016, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- **Nieva, Amira Susana.** *Lotus spp. asociated soil microorganisms.* VI Workshop of Lotus spp. 24 al 27 de Febrero del 2016. Chascomús, Buenos Aires, Argentina.
- **Nieva, A. S.;** Echeverria, M. Menendez, A. Ruiz, O. *Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato de cepas fúngicas aisladas de la endorizosfera de Lotus spp. y especies acompañantes.* XV Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología. Chascomús, Buenos Aires, 4 al 6 de Diciembre del 2013.

Información genómica depositada en bases de datos de acceso público

Secuencias obtenidas por amplicon sequencing:

- Secuencias V4 de la región 16S: NCBI Accesion code: *PRJNA2855990*.
- Secuencias ITS de la región 18S: NCBI Accesion code: *PRJNA378673*.

Dedicatoria

A la memoria de Malvina Susana Véliz...

... mi abuela "Cuca"

Índice de Contenidos

Resumen.....	19
Abreviaturas.....	21
Introducción general.....	24
Suelos de la Pampa Deprimida.....	25
El uso del suelo en los agroecosistemas	28
Vegetación.....	29
Leguminosas forrajeras. El género <i>Lotus</i>	31
El concepto de “calidad de suelos”	32
Importancia del estudio de comunidades microbianas de los suelos	33
Nuevas tecnologías de secuenciación	34
Relaciones entre los microorganismos y las especies vegetales	35
Capítulo 1.....	39
Caracterización de la comunidad bacteriana de los suelos de la Pampa Deprimida, bajo el efecto de la práctica de promoción de <i>Lotus tenuis</i>	39
Promoción de <i>Lotus tenuis</i>	40
Influencia de las especies vegetales sobre el ecosistema suelo	41
Plataformas de secuenciación masiva	41
Unidad taxonómica: “OTU”	43
Análisis de los resultados obtenidos a través de tecnologías de NGS	44
Importancia de la información taxonómica	46
Hipótesis	48
Objetivos	48
Materiales y Métodos	49
Sitios de estudio	49
a) Lotes en condiciones de pastizal natural	50
b) Tratamiento con herbicidas en los lotes promovidos	50
Recolección de muestras, acondicionamiento y extracción del material genómico	52
Preparación de las librerías de amplicones.....	52
Demultiplexado de las secuencias y filtrado por calidad	53
Agrupación de las secuencias en OTUs	53

Elección de la secuencia representante.....	54
Alineamiento de las secuencias y asignación taxonómica	54
Generación de la tabla de OTUs.....	54
Estandarización y transformación	55
Generación de las curvas de rarefacción	55
Análisis de Diversidad	56
Diversidad alfa	56
Diversidad Beta	57
Análisis taxonómico	59
Resultados	60
Análisis de Diversidad Alfa	61
Análisis de Diversidad Beta	62
Análisis estadístico multivariado	65
Composición taxonómica.....	66
Análisis del “core microbioma” para cada sitio	73
Discusión	78
Conclusión	83
Diagrama Resumen – Capítulo 1	85
Capítulo 2.....	86
Caracterización de la comunidad fúngica de los suelos de la Pampa Deprimida, bajo el efecto de la práctica de Promoción de <i>Lotus tenuis</i> . Influencia de los factores abióticos en la distribución de la comunidad	86
Hipótesis	92
Objetivos	92
Materiales y Métodos	93
Sitios de estudio	93
Recolección de muestras, acondicionamiento y extracción del material genómico	93
Preparación de las librerías de amplicones.....	94
Demultiplexado de las secuencias y filtrado por calidad	94
Agrupación de las secuencias en OTUs	94
Elección de la secuencia representante.....	95
Alineamiento de las secuencias y asignación taxonómica	95
Generación de la tabla de OTUs.....	95
Estandarización y transformación	95

Generación de las curvas de rarefacción	95
Análisis de Diversidad	95
Diversidad alfa	95
Diversidad Beta	95
Análisis taxonómico	96
Análisis de las variables físico-químicas del suelo	96
Correlación con variables físico-químicas del suelo	97
Resultados	99
Análisis de Diversidad alfa	100
Análisis de Diversidad Beta	101
Composición taxonómica	105
Relación entre la distribución de la comunidad de hongos y las variables ambientales del suelo con influencia sobre los mismos	112
Discusión	119
Conclusión	124
Diagrama Resumen – Capítulo 2	125
Capítulo 3	126
Caracterización de aislamientos fúngicos obtenidos de la endorizosfera de <i>Lotus tenuis</i> y especies acompañantes, que crecen en suelos de la Pampa Deprimida. Relación con la capacidad solubilizadora de fosfato y tolerancia a condiciones extremas	126
Introducción	127
Organismos endofitos	128
Hipótesis	130
Objetivos	130
Materiales y Métodos	131
Sitios de muestreo	131
Recolección	131
Aislamiento de cepas fúngicas	131
Almacenamiento	132
Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico	132
Cultivo de los aislamientos	132
Cuantificación de la biomasa fúngica producida durante el período de incubación	133
Cuantificación del fosfato inorgánico solubilizado a partir de Fosfato tricálcico	133

Evaluación de la tolerancia por parte de las cepas fúngicas a diferentes concentraciones de salinidad por NaCl	134
Evaluación de la capacidad de crecimiento según el pH.....	135
Medios de cultivo	135
Identificación de los aislamientos más promisorios por su alta capacidad para solubilizar fosfato y tolerar elevados niveles de pH y salinidad.....	136
Análisis de los datos	137
Resultados	139
Capacidad de las cepas para solubilizar fosfato	139
Tolerancia de los aislamientos a niveles crecientes de NaCl	140
Crecimiento de los aislamientos a diferentes pH.....	146
Conclusión	159
Diagrama Resumen – Capítulo 3	160
Capítulo 4.....	161
Interacciones entre leguminosas del género <i>Lotus</i> y hongos endofitos	161
La interacción <i>Lotus spp.-Fusarium solani</i> como modelo de estudio	161
Introducción.....	162
Interacciones planta-hongos endofitos.....	162
Otras aproximaciones metodológicas para evaluar la relación costo/beneficio de la interacción	163
Organismos del género <i>Fusarium</i> como endofitos	164
Evaluación de la interacción <i>Fusarium spp-Lotus spp</i>	165
Hipótesis	167
Objetivos	167
Materiales y Métodos	168
Material biológico.....	168
Germoplasma	168
Tratamiento pre-germinativo y desinfección.....	168
Inóculo fúngico	168
Diseño experimental	169
Trasplante e inoculación	169
Condiciones de cultivo	170
Control de infección	171
Evaluación del crecimiento de las plantas	171

Evaluación de la actividad fotosintética a tiempo final.....	171
Evaluación del estado del PSII	171
Análisis del metabolismo primario resultante de la interacción <i>Lotus spp-Fusarium solani</i>	172
Análisis estadísticos	173
Resultados	175
Efecto del endofito sobre el desarrollo del hospedante	177
Evaluación de los parámetros fotosintéticos a tiempo final.	180
Evaluación de parámetros relacionados al funcionamiento del FOTOSISTEMA II	182
Perfil metabólico resultante de la interacción <i>Lotus spp-F. solani</i>	184
Discusión	195
Azúcares	197
Aminoácidos	198
Fosfatos.....	198
Ácidos orgánicos	199
Fenilpropanoides	200
Poliolios.....	201
Efectos de la interacción, según la especie hospedante	202
Conclusión	203
Diagrama Resumen – Capítulo 4	204
Conclusión general.....	205
Bibliografía	209

Índice de Tablas y Figuras

Tabla N° 1.1. Modelo de tabla de OTUs, formada a partir del análisis de secuencias generadas por secuenciación masiva.	55
Tabla N° 1.2. Análisis PERMANOVA considerando sitio y uso del suelo, basado en las matrices de distancias.....	65
Tabla 2.1. Análisis PERMANOVA sitio y uso del suelo.....	104
Tabla N° 2.2. Parametros físico-químicos del suelo, para cada una de las situaciones tratamiento y uso del suelo.....	112
Tabla N° 2.3. ANOVA de dos vías para los factores sitio (Manantiales 1, La Bellaca y Manantiales 2) y uso del suelo (Pastizal natural y Promoción de <i>L. tenuis</i>) en todos los parámetros físico-químicos cuantificados..	113
Tabla N° 2.4. Coeficientes de correlaciones de Spearman para las variables físico-químicas del suelo y los OTUs agrupados a nivel de phylum	116
Tabla N° 3.1: Soluciones tampón utilizadas para estabilizar el pH de cada uno de los medios de cultivo preparados para diferentes pH finales.....	136
Tabla N° 3.2. Regresión lineal del crecimiento sobre el las concentraciones de salinidad, para las 21 cepas evaluadas en medio APD, a 0, 100, 150 y 200 mM de NaCl, luego de un periodo de incubación de 7 días.....	142
Tabla N° 3.3. Regresión lineal del crecimiento sobre el pH, para las 21 cepas evaluadas en medio AMP, en un rango de pH 5-11, luego de un periodo de incubación de 7 días.....	149
Tabla N° 3.4. Clasificación cruzada (tasa de error aparente), resultante del análisis discriminante realizado sobre la clasificación de las 21 cepas agrupadas según <i>L. tenuis</i> , <i>Atriplex</i> sp., <i>Distichlis</i> sp. y <i>Portulaca</i> sp.	155
Tabla N° 4.1. Composición de las soluciones stock para la preparación de la solución nutritiva de riego “Evans”.	170
Figura N° 1. “Áreas pampeanas” de la República Argentina.	25
Figura N° 2. Toposecuencia típica de un suelo de la Pampa Deprimida.....	27
Figura N° 3. Representación de la disposición de los suelos de la toposecuencia definida por Batista y col en el año 2005, sobre la superficie de un terreno productivo.	27
Figura N° 4. Uso del suelo en las diferentes áreas pampeanas de la República Argentina.	30
Figura N° 1.1. Etapas de la técnica de pirosecuenciación <i>454-Roche</i>	43

Figura N° 1.2: Diagrama de sitios de estudio.	51
Figura N° 1.3. Región V4 del gen ribosómico 16s.	60
Figura N° 1.4. Curvas de rarefacción del número de OTUs observados sobre el número de secuencias ó lecturas obtenidas. por secuenciación de la región V4 del gen ribosomal 16S.	56
Figura N° 1.5. Índices de diversidad alfa referidos a los OTUs obtenidos por secuenciación del gen ribosomal 16S de las muestras de suelos de la Pampa Deprimida.	61
Figura N° 1.6: Análisis de Coordenadas Principales en base a las matrices de distancias Diversidad beta (comunidad bacteriana).....	63
Figura N° 1.7. Diagrama de Venn, en base a los diferentes OTUs obtenidos mediante agrupamiento de las secuencias al 97% de similitud..	66
Figura N° 1.8. Composición general de <i>phyla</i> presentes en el análisis de los suelos tomados como muestras representativas de la Pampa Deprimida.	67
Figura N° 1.9. Composición taxonómica a nivel de <i>phyllum</i> de las secuencias agrupadas en OTUs al 97% de similitud.	68
Figura N° 1.10. Heatmap basado en la abundancia de OTUs pertenecientes al <i>phyllum Acidobacteria</i> , para cada una de las muestras evaluadas. Muestras y OTUs agrupados según el algoritmo <i>Pearson</i>	70
Figura N° 1.11. Heatmap basado en la abundancia de OTUs pertenecientes al <i>phyllum Verrucomicrobia</i> , para cada una de las muestras evaluadas. Muestras y OTUs agrupados según el algoritmo de <i>Pearson</i>	71
Figura N° 1.12. Heatmap basado en la abundancia de OTUs pertenecientes al <i>phyllum Chloroflexi</i> , para cada una de las muestras evaluadas. Muestras y OTUs agrupados según el algoritmo de <i>Pearson</i>	72
Figura N° 1.13. Heatmap basado en la abundancia de OTUs pertenecientes al <i>phyllum Planctomycetes</i> , para cada una de las muestras evaluadas. Muestras y OTUs agrupados según el algoritmo de <i>Pearson</i>	73
Figura N° 1.14. OTUs miembros del <i>core microbiome</i> para cada uno de los sitios evaluados: a) Manantiales 1; b) La Bellaca; c) Manantiales 2.	74
Figura N° 2.1. Distribución de los taxones que componen la comunidad de hongos de los suelos, a nivel global y para ecosistemas de Pasturas.....	90
Figura N° 2.2. Región ITS del gen ribosomal 18S.....	99

Figura N° 2.3. Curvas de rarefacción del número de OTUs observados sobre el número de secuencias ó lecturas obtenidas por secuenciación de la región ITS1-ITS2 del gen ribosomal 18S.	100
Figura N° 2.4. Índices de diversidad alfa referida a los OTUs obtenidos por secuenciación del gen ribosomal 18S de las muestras de suelos de la Pampa Deprimida.....	101
Figura N° 2.5: Análisis de Coordenadas Principales en base a las matrices de distancias.....	101
Figura N° 2.6. Diagrama de Venn, en base a los diferentes OTUs obtenidos mediante agrupamiento de las secuencias del gen 18S al 97% de similitud.....	105
Figura 2.7. Composición taxonómica a nivel de phylum de las secuencias agrupadas en OTUs al 97% de similitud.	106
Figura N° 2.8. Clases del <i>phylum Ascomycota</i>	107
Figura N° 2.9.Heatmap correspondiente a los OTUs pertenecientes a las clases del phylum <i>Ascomycota</i> que modificaron su composición, luego de la práctica de promoción de <i>L. tenuis</i>	108
Figura N° 2.10. OTUs miembros del “ <i>core mycobiome</i> ” para cada condición.....	110
Figura N° 2.11. Análisis de Componentes Principales (PCA) para las variables físico-químicas de los suelos de cada una de las muestras evaluadas.....	114
Figura N° 2.12. <i>Scatterplot</i> de los dos primeros ejes resultantes del Análisis de Correspondencias Canónicas (CCA).....	117
Figura N° 3.1. Criterio simbiótico utilizado para clasificar los tipos de hongos endófitos, según Rodríguez y colaboradores, (2009).....	129
Figura N° 3.2. Apariencia de la reacción obtenida mediante fosfato de molibdeno en combinación con Ácido orto-fosfórico en placa <i>multiwell</i>	134
Figura N° 3.3: Valores de solubilización de fosfato expresados en ppm P por gramo de biomasa fúngica producida, luego de un periodo de 7 días de incubación.....	139
Figura N° 3.4. Crecimiento en diámetro (mm) de las 21 cepas fúngicas aisladas a partir de raíces de <i>L. tenuis</i> , <i>Atriplex</i> sp., <i>Distichlis</i> sp. y <i>Portulaca</i> sp., en medio AMP con pH 5,6,7,8,9,10 y 11.	140
Figura N° 3.5. Regresiones lineales del crecimiento sobre la concentración de sal, estadísticamente significativas ($p<0.05$), para las 21 cepas evaluadas en medio APD suplementado con 0, 100, 150 y 200 mM de NaCl.	143

Figura N° 3.6. Crecimiento en diámetro (mm) de las 21 cepas fúngicas aisladas a partir de raíces de <i>L. tenuis</i> , <i>Atriplex</i> sp., <i>Distichlis</i> sp. y <i>Portulaca</i> sp., en medio AMP con pH 5,6,7,8,9,10 y 11.	146
Figura N° 3.7. Regresiones lineales múltiples del crecimiento sobre el pH, estadísticamente significativas al ($p < 0.0001$) para cepas aisladas de <i>L. tenuis</i>	150
Figura N° 3.8. Regresiones lineales múltiples del crecimiento sobre el pH, estadísticamente significativas al ($p < 0.0001$) para cepas aisladas de <i>Distichlis</i> sp.....	151
Figura N° 3.9. Regresiones lineales múltiples del crecimiento sobre el pH, estadísticamente significativas al ($P < 0.0001$) para cepas aisladas de <i>Portulaca</i> sp.....	152
Figura N° 3.10. Regresiones lineales múltiples del crecimiento sobre el pH, estadísticamente significativas al ($P < 0.0001$) para cepas aisladas de <i>Atriplex</i> sp.....	152
Figura N° 3.11. Análisis de componentes principales de las 21 cepas fúngicas aisladas a partir de raíces de <i>L. tenuis</i> , <i>Atriplex</i> sp., <i>Distichlis</i> sp. y <i>Portulaca</i> sp., según su capacidad para crecer a 200 mM NaCl, a pH=11, y para solubilizar fosfato.....	153
Figura N° 3.12. Análisis de discriminante de las 21 cepas fúngicas aisladas a partir de raíces de <i>L. tenuis</i> , <i>Atriplex</i> sp., <i>Distichlis</i> sp. y <i>Portulaca</i> sp., según su capacidad para crecer a concentraciones crecientes de NaCl y pH y para solubilizar fosfato.....	154
Figura N° 4.1. Tipos de interacciones entre diferentes especies.....	162
Figura N° 4.2. Esquema de tratamientos utilizados para la evaluación de la interacción <i>Lotus spp</i> - <i>F. solani</i>	169
Figura N° 4.3. Imágenes tomadas con microscopio óptico a 400x, de las tinciones de micelio con colorante azul de tripan.	175
Figura N° 4.4. Apariencia de las plantas de <i>L. japonicus</i> y <i>L. tenuis</i> inoculadas con <i>F. solani</i> (142L52B), cosechadas 35 dpi.	177
Figura N° 4.5. Biomasa aérea, expresada como mg de peso seco de vástago, para cada una de las especies evaluadas, inoculadas con <i>F. solani</i> (142L52B), luego de 35 dpi.....	178
Figura N° 4.6. Biomasa radical, expresada como mg de peso seco de vástago, para cada una de las especies evaluadas, inoculadas con <i>F. solani</i> (142L52B), luego de 35 dpi.	178
Figura N° 4.7. Área foliar, expresada en cm ² , para cada una de las especies evaluadas, inoculadas con <i>F. solani</i> (142L52B), luego de 35 dpi.....	179

Figura N° 4.8. Número de tallos, para cada una de las especies evaluadas, inoculadas con <i>F. solani</i> (142L52B), luego de 35 dpi.....	179
Figura N° 4.9. Intercambio de CO ² o Fotosíntesis Neta (PN), expresada como $\mu\text{MolCO}_2/\text{m}^2$	180
Figura N° 4.10. Conductancia estomática (SC), expresada como $\text{mMol}/\text{m}^2.\text{s}$	181
Figura N° 4.11. Eficiencia en el uso del agua (EUA), cuantificada a tiempo final, luego de 35 dpi.	181
Figura N° 4.12. Eficiencia en la fijación de CO ² (CI), cuantificada a tiempo final, luego de 35 dpi.	182
Figura N° 4.13. Rendimiento Cuántico Máximo del Fotosistema II (Fv/Fm), registrado a tiempo final, luego de 35 dpi.....	183
Figura N° 4.14. Índice de <i>Performance</i> (Plabs), registrado a tiempo final, luego de 35 dpi.....	183
Figura N° 4.15. Azúcares detectadas en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento.....	184
Figura N° 4.16. Azúcares detectadas en raíces mediante GS-IC/MS-TOF para cada tratamiento.	185
Figura N° 4.17. Aminoácidos detectados en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento.	185
Figura N° 4.18. Aminoácidos detectados en raíces mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento.....	186
Figura N° 4.19. Ácidos orgánicos detectados en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento.....	186
Figura N° 4.20. Ácidos orgánicos detectados en raíces mediante GS-IC/MS-TOF para cada tratamiento.....	187
Figura N° 4.21. Fosfatos detectados en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento.....	189
Figura N° 4.22. Fosfatos detectados en raíces mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento.	189
Figura N° 4.23. Fenilpropanoides detectados en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento.....	189
Figura N° 4.24. Fenilpropanoides detectados en raíces mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento.....	190

Figura N°4.25. Polioles detectados en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento.....	190
Figura N° 4.26. Polioles detectados en raíz mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento.....	191
Figura N° 4.27. Análisis de componentes principales basado en los metabolitos obtenidos mediante GC-IC/MS-TOF en las hojas analizadas de <i>L. japonicus</i> y <i>L. tenuis</i> , para los tratamientos “Control” y “ <i>F. solani</i> (142L52B).....	193
Figura N° 4.28. Análisis de componentes principales basado en los metabolitos obtenidos mediante GC-IC/MS-TOF en las raíces analizadas de <i>L. japonicus</i> y <i>L. tenuis</i> para los tratamientos “Control” y “ <i>F. solani</i> (142L52B)”	194

Resumen

La Pampa Deprimida es una región de la provincia de Buenos Aires que abarca un área de 90000 km². Esta región está caracterizada por áreas sometidas a inundaciones frecuentes y con drenaje deficiente, que las tornan no propicias para la agricultura. Adicionalmente, existen otras limitaciones tales como el pH edáfico elevado, las concentraciones elevadas de sales, sodicidad y la baja fertilidad. Es por ello, que la actividad productiva de la región está fuertemente asociada a la cría de ganado bovino.

Por otra parte, las pasturas nativas y/o naturalizadas de la Pampa Deprimida, se caracterizan por ser estepas de gramíneas de baja calidad forrajera y por la ausencia de leguminosas de buena aptitud forrajera. Es por ello que resulta tecnológicamente relevante, contar con especies leguminosas que puedan mejorar la oferta forrajera y además, puedan adaptarse a las condiciones edáficas de la región. Las especies del género *Lotus* constituyen una buena alternativa, no solo por su alta productividad, sino también por sus reconocidas tolerancias a diferentes tipos de estreses abióticos. Dentro del género, la leguminosa de origen mediterráneo *L. tenuis*, constituye un ejemplo muy singular de naturalización exitosa en estos ecosistemas marginales, estimándose su proceso de introducción muy reciente (alrededor de 60 años). En un intento de mejorar su implantación y persistencia, se ha diseñado una técnica de bajo costo, denominada “promoción”, la cual se ha extendido con éxito en la región. Dicha técnica se basa en el uso de herbicidas que conlleva a que *L. tenuis* se convierta en la especie leguminosa predominante al cabo de algunos años. Esta situación es contrastante con la comunidad herbácea presente en condiciones naturales, que cuenta tanto con vegetación nativa, como naturalizada luego de la introducción de especies de valor forrajero como *Festuca arundinacea* y *Trifolium repens*. Sin embargo, la vegetación es predominantemente monocotiledónea, por lo cual las propiedades físicas de los primeros centímetros de la profundidad del perfil del suelo, difieren considerablemente del perfil bajo la influencia de *L. tenuis*.

Asociado a dicho proceso, entendimos de importancia realizar el estudio de las comunidades de microorganismos presentes en este ecosistema y las posibles modificaciones que pudieran generarse debidas a la práctica de promoción, para evaluar la sustentabilidad de la actividad, a mediano y largo plazo.

A partir de los resultados del análisis de las comunidades de bacterias y hongos, realizado mediante la técnica de secuenciación masiva, sobre muestras de material genómico de

suelo, se determinó que el monocultivo de *L. tenuis* no modificó la estructura de las comunidades bacterianas, pero sí las comunidades fúngicas de los suelos, sujetos a las prácticas de promoción. En el caso de la comunidad fúngica, se evidenció además un incremento en la abundancia de organismos del género *Fusarium* lo que nos indujo a realizar aislamientos de la endorizosfera de *L. tenuis* creciendo en condiciones de suelos halomórficos. Se determinó la capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico de las cepas aisladas, en condiciones *in-vitro*, observándose que aquellas con mayor capacidad pertenecieron al género *Fusarium*. Además de dicha propiedad, las cepas fúngicas seleccionadas, presentaron la capacidad de crecer en presencia de elevadas concentraciones de NaCl y en un amplio rango de pH.

Debido a la importante presencia de hongos pertenecientes al género *Fusarium* tanto en la rizosfera, como en la endorizosfera de *L. tenuis*, se procedió a evaluar la interacción entre un aislamiento identificado como *F. solani* y dos especies del género *Lotus* (*L. japonicus* y *L. tenuis*). Como resultado de las interacciones evaluadas, pudo evidenciarse un efecto diferencial especie-específico sobre ambos hospedantes. El efecto resultante en la interacción con la especie modelo *L. japonicus* determinó un aumento en la biomasa de raíces y vástagos, en la fijación del CO², en el incremento en la eficiencia del uso del agua, y en los niveles de glucosa, fructosa y compuestos fosforados. Simultáneamente pudo observarse que *L. tenuis* sometido a la misma interacción sufrió una disminución en la biomasa de vástago y raíces, así como también de los niveles de compuestos fosforados y azúcares simples.

Los resultados obtenidos dejan entrever la posibilidad de que las interacciones entre *L. tenuis* y los organismos endofitos adaptados a condiciones edáficas marginales de la Pampa Deprimida, pudieron tener importancia en la adaptación y naturalización de la especie leguminosa en la región. Su elevada tolerancia frente a los diferentes estreses abióticos presentes, justifican plenamente un estudio pormenorizado de dichas interacciones y sus potenciales incidencias en la promoción y en el proceso de naturalización del *L. tenuis*. Asimismo entendemos que la evidencia generada podría llevar a la mejor comprensión de los principios ecológicos sobre los cuales se asienta el progreso evolutivo de las interacciones entre ciertos microorganismos y especies de interés agronómico adaptadas a ecosistemas marginales para la agricultura.

Abreviaturas

MAA: Medio de cultivo Agar-Agua.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIA: Ácido Indol Acético

AMP: Medio de cultivo Agar Malta Peptonado.

ANAMOX: *ANAerobic AMonium OXidation* (Oxidación anaeróbica del amonio).

AP: Fósforo disponible.

APD: Medio de cultivo Agar Papa Dextrosado.

BFN: Bacterias Fijadoras de Nitrógeno atmosférico.

Bic: Bicarbonatos.

Ca: Calcio.

CCA: *Canonical Correspondence Analysis* (Análisis de Correspondencias Canónicas).

CE: Conductividad eléctrica.

CI: Carbono de la cámara subestomática – Eficiencia en la Fijación de CO².

CIC: Capacidad de Intercambio Catiónico.

Clo: Cloruros.

CO: Carbono orgánico.

Dpi: Días Post Inoculación.

EI: *Electron impact* (Impacto electrónico)

EMM: Medio de cultivo Agar Extracto de Malta Maltosa.

Ex_Ca: Calcio Intercambiable.

Ex_K: Potasio Intercambiable.

Ex_Mg: Magnesio Intercambiable.

Ex_Na: Sodio Intercambiable.

FBN: Fijación Biológica del Nitrógeno atmosférico.

Fe: Hierro

Fv/Fm: Rendimiento Cuántico máximo del Fotosistema II.

GC: *Gas Chromatography* (Cromatografía gaseosa)

HMA: Hongos Micorrizico-Arbusculares.

HTP: *High Throughput Sequencing* (Secuenciación de alto rendimiento).

ITS: *Internal Transcribed Spacer*, (Espaciador interno transcrita).

K: Potasio.

MS: *Mass spectrometry* (Espectrometría de masas)

Mg: Magnesio.

MO: Materia Orgánica.

N: Nitrógeno orgánico.

Na: Sodio.

NBRIP: Medio de cultivo para cuantificación de la actividad solubilizadora de fosfato:
National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium.

NGS: *Next Generation Sequencing* (Secuenciación de segunda generación).

NMDS: *Non-Metric Multidimensional Scaling* (Escalamiento multidimensional no métrico).

OTU: *Operational Taxonomic Unit* (Unidad Taxonómica Operativa).

P: Fósforo.

PCA: *Principal Components Analysis* (Análisis de componentes principales)

PCoA: *Principal Coordinates Analysis* (Análisis de coordenadas principales).

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa).

PERMANOVA: *Permutational Variance Analysis* (Análisis Permutacional de la Varianza).

Plabs: Índice de Performance del Fotosistema II

PN: Fotosíntesis Neta.

PSI: Porcentaje de Sodio Intercambiable.

PSII: Fotosistema II.

PyNASt: *Python Nearest Alignment Space Termination*.

RAS: Relación de Absorción de Sodio

SC: Conductancia estomática.

Sul: Sulfatos.

Q_A: Quinona A

QIIME: Software *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*.

TEF: α 1-*Transcription Elongation Factor*.

TOF: *Time of flight* (tiempo de vuelo).

UNITE: Base de datos *Unified System for the DNA based fungal species linked to the classification*.

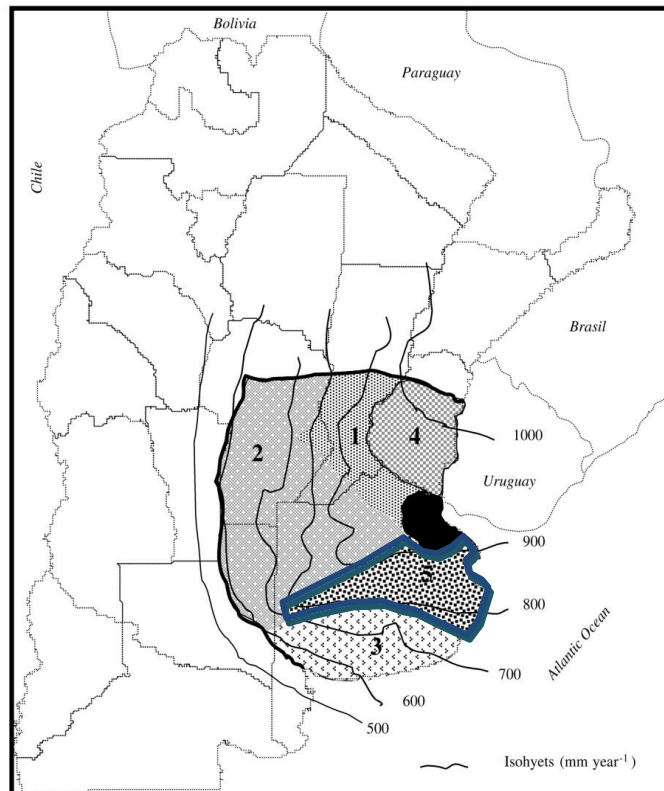
VIF: *Variance Inflation Factor* (Factor de Inflación de la Varianza).

Introducción general

Suelos de la Pampa Deprimida

La “Pampa Deprimida” es un área de la provincia de Buenos Aires, que abarca una superficie de 90000 km² (Figura N° 1). El 70% de ésta área está ocupado por pastizales, de la cual un 15% es destinado a la actividad agrícola y ganadera.

Figura N° 1. “Áreas pampeanas” de la República Argentina. (Adaptado de Viglizzo y col., 2001).



Las características más distintivas de la región son las inundaciones recurrentes y la baja fertilidad de los suelos, lo cual limita la producción de pasturas cultivadas (Sierra y Montecinos, 1990; Soriano y col., 1992). Debido al relieve plano, el agua de escurrimiento no alcanza a formar una red de drenaje desarrollada y por esto, los sistemas fluviales son muy escasos (Etchevehere, 1961).

Los procesos de formación de los suelos de la Pampa Deprimida involucran material sedimentario, sobre una depresión tectónica, modelado por ingresos del Océano Atlántico y por la acción eólica (Vervoorst, 1967; Tricart, 1973).

En términos edáficos, existen al menos cuatro tipos de suelos diferenciados, distribuidos a lo largo de un gradiente o secuencia topológica (Figura N° 2). Los cuatro tipos de suelos son los que se detallan a continuación:

- Loma: Los suelos de loma corresponden a la clase *Hapludoll* ó *Argiudoll* (Soil Taxonomy-USDA, 1998). Son suelos profundos, bien drenados, que no se inundan y no presentan limitaciones por alcalinidad o salinidad en todo el perfil. Son, en general, suelos con buena aptitud agrícola, destinada al cultivo de leguminosas de grano, maíz y algunas hortalizas.
- Media loma: En las zonas de media loma, los suelos corresponden a la clase *Natraquoll*. Estos suelos presentan un horizonte superficial de 15 a 20 cm de profundidad, con buen contenido de materia orgánica (MO); no son alcalinos ni salinos.
- Suelos de bajos alcalinos: Estos suelos presentan una alta concentración de sales y reacción alcalina en todo su perfil. El horizonte superficial es muy delgado con bajo contenido de MO. Aquí se presentan las condiciones menos propicias para la agricultura. El grupo taxonómico de estos suelos corresponde a *Natracualf* (Soil Taxonomy –USDA, 1998).
- Bajo dulce: Los bajos inundables o dulces presentan inundaciones frecuentes. Sin embargo no son de características salinas o alcalinas. Estos suelos corresponden a la clase taxonómica *Argiaboll* (Soil Taxonomy –USDA, 1998).

Otra característica interesante, es que la distribución de estas condiciones edáficas no se encuentra en forma de un gradiente continuo, sino que forman “parches” de diferentes tipos de suelos a lo largo de la superficie (Figura N° 3). Esta característica de distribución de los diferentes tipos de suelos, determina que se requiera de planificación productiva para cada zona y diversificación de la producción.

Figura N° 2. Toposecuencia típica de un suelo de la Pampa Deprimida. (Batista y col., 2005, extraído de <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/pastoreo-controlado-herramienta-manejo-t30446.htm>).



Figura N° 3. Representación de la disposición de los suelos de la toposecuencia definida por Batista y col en el año 2005, sobre la superficie de un terreno productivo. (Adaptado de Rodríguez y Jacobo, 2013. Extraído de <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/pastoreo-controlado-herramienta-manejo-t30446.htm>).



El uso del suelo en los agroecosistemas

El suelo es un recurso no renovable a corto plazo, y el sostén de toda actividad relacionada con la producción agrícola. Es un sistema complejo, en donde se producen reacciones químicas, físicas e interacciones biológicas. Cada suelo tiene una historia de formación, con implicancia directa en las características tanto climáticas como geográficas. La composición del material originario y sus modificaciones a través del tiempo, dan origen a ciertas características que definen diferentes clases taxonómicas de suelo. La variación de una característica de formación, como ser el material originario de la roca madre, o el régimen hídrico, pueden dar origen a suelos muy diferentes, con diferentes capacidades de retención de agua y permeabilidad de gases.

En relación a la aptitud agrícola, el suelo puede presentar características deseables desde el punto de vista productivo, como ser: una buena capacidad de retención hídrica, buena estructuración, una cantidad adecuada de MO que brinde la fertilidad necesaria para la producción, etc. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las características deseables del recurso suelo no son suficientes y los productores deben recurrir a la introducción de tecnologías ó *inputs* en el sistema. Estas tecnologías pueden ir desde la labranza tradicional, hasta la aplicación de productos de síntesis química. Un punto importante radica en la necesidad del buen uso de estas prácticas, que garanticen la sustentabilidad del recurso suelo a través del tiempo. A partir de la expansión de la frontera agrícola y la revolución verde, el uso de las tecnologías en forma desmesurada y la mala utilización de manejos relacionados con la labranza han llevado a procesos de erosión ó pérdida de suelos, pérdida de la fertilidad química, degradación, contaminación de napas subterráneas y acuíferos y en el peor de los casos, a la desertificación. En las últimas décadas, surgieron nuevas tecnologías destinadas a mejorar las prácticas de manejo productivo y a prevenir los procesos de degradación. Estas prácticas son conocidas en la actualidad como “buenas prácticas agrícolas” y están relacionadas con el uso de sistemas de siembra directa y rotación de cultivos. Algunos de estos sistemas de manejo incluyen el uso de productos de síntesis química, conocidos popularmente como “agroquímicos”, en especial herbicidas.

Vegetación

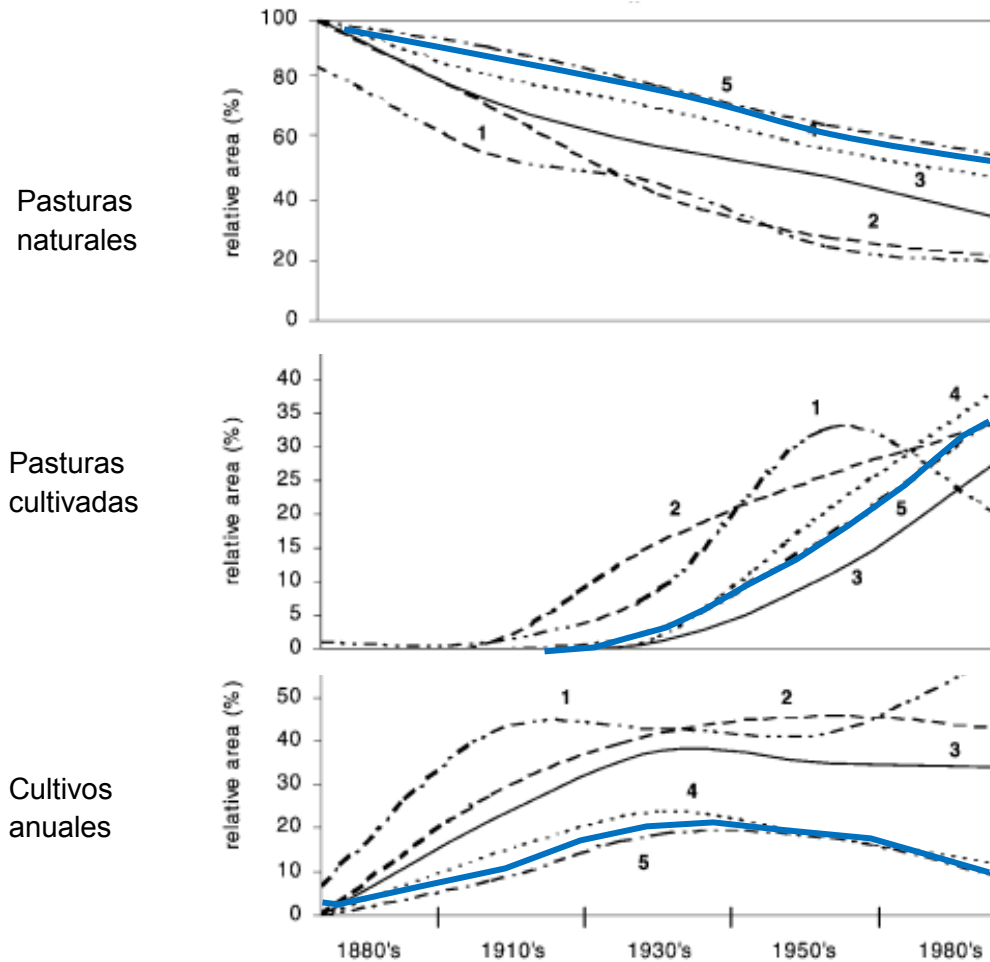
La correspondencia entre suelos y comunidades vegetales en el pastizal de la Pampa Deprimida, permite suponer que la heterogeneidad del ambiente edáfico controla la distribución de especies vegetales en el paisaje (Batista, 1991; Perelman, 1996).

La vegetación de la zona corresponde a un “mosaico” de comunidades de pasturas que se encuentran distribuidas en relación a las propiedades del suelo. De este modo, la comunidad fitogeográfica corresponde a una pradera de pasturas (León y col., 1975).

Las actividades ganaderas de la región, tales como la cría, invernada o lechería se ven afectadas por la falta de forraje en cantidad y calidad. Estas deficiencias son compensadas en algunos casos con sorgos ó forrajes derivados del cultivo de soja, los cuales implican un costo importante para el productor y además dependen de la estacionalidad de las lluvias.

Dadas las limitaciones mencionadas anteriormente, en la Pampa Deprimida del río Salado, se ha implementado el cultivo de pasturas, como recurso para la alimentación del ganado. Las pasturas cultivadas están dominadas por leguminosas no nativas, generalmente de origen europeo (Sala y col., 1986). Este proceso se realiza a través de un desplazamiento de las pasturas nativas para dar lugar a aquellas cultivadas con mejor calidad forrajera. Por su parte, las áreas con mejores cualidades edáficas son destinadas a la producción de cultivos anuales (Figura N° 4). Esta tendencia de aprovechamiento del suelo fue incrementándose a través de los años transformando a la región de la Pampa Deprimida en el área ganadera de cría por excelencia en la República Argentina.

Figura N° 4. Uso del suelo en las diferentes áreas pampeanas de la República Argentina. Adaptado de Viglizzo y col., 2001. 1: Pampa ondulada; 2: Pampa Central; 3: Pampa Sur; 4: Pampa Mesopotámica; **5: Pampa Deprimida**.



Es importante tener en cuenta que la receptividad ganadera del pastizal natural a lo largo de los años, disminuyó, como consecuencia del sobrepastoreo. Este fenómeno llevó a que las pasturas introducidas sean utilizadas en intersembra ó cultivadas en en forma de rotaciones (Lara y Gandini, 2016). Las pasturas que participaron en primera instancia en esta incorporación fueron *Festuca* y *Agropyron* y en segundo lugar *Lotus* y *Trifolium* (Rodríguez y Jacobo, 2012).

La incorporación de pasturas no nativas al ecosistema de la Pampa Deprimida, llevó a la invasión del ecosistema por parte de las especies europeas introducidas (Sala, 1988). Perelman y colaboradores (2001) observaron que la distribución de las especies exóticas en la Pampa Deprimida, superó la distribución de las especies nativas, que se mantienen confinadas en áreas más estrechas. La introducción de flora exótica con fines forrajeros, en

conjunto con el pastoreo, favoreció a las especies no nativas. Esto es debido a que las características topográficas, ubicaron a las especies introducidas en gradientes determinados por factores tales como el drenaje y la salinidad (Sala, 1986; 1988), debido a que los hábitats edáficos son mas diversos que la flora que se asienta sobre los mismos y tienen una amplia heterogeneidad en relación a los diferentes nichos que pueden ofrecer (Perelman, 2001).

Leguminosas forrajeras. El género *Lotus*

Las leguminosas son una familia ampliamente distribuida, con aproximadamente 720 géneros y más de 18000 especies distribuidas en todo el mundo (Wojciechowski, 2003). Dentro de las mismas se encuentra el género *Lotus*. La mayoría de las especies del género *Lotus* son nativas de Europa, Asia, Africa, Australia y algunas de las islas de los océanos Atlántico y Pacífico (Kirkbride, 1999; Degtjareva y col., 2008). El centro más importante de diversidad para las especies del género *Lotus* se encuentra en la zona del Mediterráneo (Díaz y col., 2005). En el Continente Americano, la introducción de las especies en áreas no nativas fue debida fundamentalmente a la actividad entrópica y a lo que se ha sumado, la adaptabilidad de *Lotus spp.* a diferentes estreses abióticos (Belesky, 1999; Blumenthal y McGraw, 1999). Esta característica derivó en la introducción del género en la actividad ganadera de la Pampa Deprimida.

Varias especies del genero *Lotus* tienen importancia agronómica y como diversas leguminosas, presentan los beneficios de una alta digestibilidad y contenido de proteína cruda. Asimismo, las especies de este género presentan por lo general, menores contenidos de fibras detergentes que otras leguminosas. Por ello, la especie *L. corniculatus* es considerada de gran importancia forrajera después de *Medicago sativa* y *Trifolium repens* (Escaray et al 2012), presentando además, la propiedad de mejorar la calidad forrajera estival de los pastizales, comparados con aquellos constituidos exclusivamente por especies de gramíneas.

Otra característica muy deseable desde el punto de vista forrajero, es la capacidad de las especies de *Lotus* de contener niveles adecuados de taninos condensados foliares, lo que las diferencia de las forrajeras clásicas como trébol y alfalfa. Es conocida la actividad de los taninos en la estabilización de las proteínas del rumen, reduciendo su fermentación y previniendo el fenómeno del meteorismo (Escaray y col., 2012).

Sumado a sus buenas aptitudes productivas, la cualidad que destaca a las especies del género *Lotus*, es su capacidad de tolerar diferentes estreses abióticos que otras leguminosas tradicionales no toleran. Especies como por ejemplo *L. creticus* puede adaptarse a ambientes salinos y áridos (Belesky, 1999; Escaray y col., 2010; Vignolio y col., 2005) y *L. uliginosus* es tolerante a aluminio (Blumenthal y McGraw, 1999; Stoutjesdijk y col., 2001), lo que lo hace además, tolerante a suelos ácidos (Wheeler y col., 1992). *L. corniculatus* es otra de las especies ampliamente utilizadas no sólo por su valor forrajero sino también como restauradora de suelos contaminados y/o afectados por salinidad, aridez ó deficiencia de nutrientes.

Lotus tenuis es una especie clave en la Pampa Deprimida por su capacidad de crecer en condiciones de anegamiento prolongado y salinidad, implantándose incluso en ecosistemas donde los cultivares tetraploides de *L. corniculatus* (reconocidos por su capacidad de tolerar salinidad) no puede hacerlo (Escaray y col., 2012). *L. tenuis* fue introducida y rápidamente naturalizada en el área (Rodríguez y Jacobo, 2012). Su uso en la dieta vacuna fue incrementándose a través de los años y actualmente constituye uno de los principales recursos forrajeros en la actividad ganadera de la Pampa Deprimida.

El concepto de “calidad de suelos”

El concepto de calidad de suelos ha sido definido por Doran y Parkin (1994) como: “*capacidad de funcionar como un sistema viviente, dentro de los límites de un ecosistema, para sostener la salud vegetal y animal y la productividad, mantener o aumentar la calidad del agua y el aire y sostener la salud y el hábitat humanos.*” Está claro que los conceptos relacionados al suelo están sujetos a la actividad agrícola y es por esto que existe la necesidad de un manejo sustentable del recurso suelo. El suelo en sí mismo, posee características que lo hacen especial frente a otros ecosistemas. Sus cualidades físicas y químicas son el conjunto de las características relacionadas a los procesos de formación que le dieron origen, ya sea naturalmente o por intervención antrópica. La combinación de las características físicas y químicas de un suelo tienen influencia sobre las capacidades tampón, filtro, aireación, circulación de agua, etc. del mismo.

Previamente, los indicadores de calidad de suelo estaban sujetos a características físicas y/o químicas del mismo, como lo son la estructuración, infiltración, contenido de MO, entre otros. En la actualidad, se considera a la diversidad microbiana un buen indicador de calidad de suelos, por presentar el atributo de ser altamente sensibles a los cambios

ambientales (Schloter y col., 2003). Por lo tanto, cualquier irrupción en el ecosistema suelo, donde habitan los microorganismos, podría modificar la diversidad de la comunidad.

Importancia del estudio de comunidades microbianas de los suelos

Los procesos bioquímicos microbianos son esenciales para la sustentabilidad de los ecosistemas y la mejor comprensión de los factores que controlan y regulan tales procesos, constituye uno de los desafíos tecnológicos más relevantes (Prosser y col., 2007). Los suelos contienen una enorme diversidad de microorganismos, la mayoría de los cuales, aun no han sido explorados. Varias metodologías moleculares como aquellas basadas en el secuenciamiento del ADN y ARN ribosomal, han permitido una mejor descripción de la diversidad microbiana de los suelos (Torsvik y col. 2002).

La importancia de los microorganismos en un agroecosistema es crucial, ya que los procesos relacionados a la nutrición vegetal están directamente vinculados a la actividad microbiana de los suelos. Los microorganismos del suelo mediante sus actividades metabólicas, ponen a disposición los nutrientes esenciales para las plantas, en las formas fácilmente asimilables. Un ejemplo claro constituye también el hecho de que los procesos involucrados en la descomposición de la MO y en el ciclado de nutrientes son llevadas a cabo, principalmente, por los microorganismos.

Es importante tener en cuenta que no todos los procesos biológicos de un suelo son llevados a cabo por un solo grupo de bacterias ó hongos, ó son exclusivos a un género o especie. En algunos casos, ciertas capacidades especiales, tales como la degradación de compuestos recalcitrantes, como la lignina, son realizadas por hongos. En otros casos, como por ejemplo, la degradación de la celulosa, es llevada a cabo sólo por algunos grupos microbianos que poseen la actividad enzimática correspondiente a la enzima β -glucosidasa. La fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN) es otro de los ejemplos de una actividad enzimática sofisticada, realizada por parte de ciertos grupos bacterianos, pertenecientes en su mayoría, al *phylum Proteobacteria*.

Es importante tener en cuenta que existe una integración entre los procesos biológicos, como así también entre las interacciones entre los organismos que habitan la microflora del suelo y otros integrantes de la micro y mesofauna. El ciclo de nutrientes se fundamenta en que muchos organismos, como resultado de sus procesos metabólicos, dejan en disposición sustratos disponibles para ser utilizados por otros organismos de la cadena

trófica. En la misma, y debido a que las condiciones de los suelos pueden llegar a ser fluctuantes tanto por cambios graduales como abruptos, también la exposición de los microorganismos frente a situaciones adversas puede ser frecuente. Basado en ello, es que podemos inferir que si se produce alguna modificación por acción antrópica y/o ambiental que pudiese alterar la dinámica de las actividades biológicas ó incluso llevar a la eliminación de algunas especies o grupos en particular, sería oportuno pensar que también alguna actividad biológica relevante pudiese desaparecer o verse limitada. Sin embargo, también debe considerarse la posibilidad de que, a pesar de que se produzca la eliminación de algunas especies, esto no conlleve a una disminución o desaparición de la actividad biológica que estaban realizando estos organismos, ya que podría ocurrir que otro grupo microbiano, con las mismas o similares capacidades, ocupe el nicho ecológico de los anteriores y que los procesos bio-geoquímicos continúen inalterados. Este proceso es conocido como “redundancia funcional” y es el responsable del mantenimiento de la sustentabilidad de los microambientes frente a las fluctuaciones ambientales.

Nuevas tecnologías de secuenciación

En la naturaleza, los microorganismos habitan diferentes ambientes, incluso aquellos lugares donde no pueden crecer organismos superiores. El cultivo de aislamientos obtenidos desde suelos es muy importante para el conocimiento y entendimiento de la fisiología, genética y ecología bacteriana (Janssen y col. 2006). Desafortunadamente, entre el 99.5 y 99.9 % de las bacterias no son cultivables en condiciones artificiales de laboratorio (Torvisk y col. 1990; Amann y col. 1995; Rappe-Giovannoni, 2003). Este porcentaje, dificulta el conocimiento íntegro acerca de las características y las capacidades bioquímicas de los organismos que cohabitan en un ecosistema. En consecuencia, es poco lo que puede deducirse en lo que respecta a sus capacidades metabólicas, mediante el análisis basado exclusivamente en el cultivo y aislamiento de microorganismos. Esta dificultad determina que exista una subestimación de la diversidad microbiana en diferentes ambientes y en consecuencia, una subestimación de la funcionalidad de las mismas. Es importante considerar que en el caso particular de ambientes edáficos, sólo el 0.3% de las bacterias presentes pueden ser cultivadas en condiciones *in-vitro* (Torvisk y col. 1990).

Las técnicas moleculares de secuenciación de ADN han permitido conocer la identidad de diferentes microorganismos, tanto cultivables como no cultivables *in-vitro*. Ello fue posible mediante el método desarrollado por Sanger y Coulson (1975), a partir del conocimiento del

código genético, que permite diferenciar dos organismos diferentes sin la necesidad de cultivarlos en condiciones *in-vitro*. En la actualidad existen técnicas denominadas Secuenciación de Segunda Generación, del inglés *Next Generation Sequencing* (NGS) ó Secuenciación de Alto Rendimiento, del inglés *High Throughput Sequencing* (HTS), las cuales están basadas en el principio de secuenciación de Sanger y Coulson, pero de forma masiva, abarcando una gran cantidad de información. Esto permite, en tiempos relativamente cortos, estudiar la información genética de un grupo de organismos diversos.

Estas herramientas sumadas a las técnicas de cultivo de microorganismos, permiten obtener información más completa acerca de los organismos que integran las comunidades microbianas de diversos ambientes, en este caso particular el ambiente edáfico. Las tecnologías de secuenciación masiva del material genómico permiten además realizar inferencias acerca de la diversidad de la comunidad de organismos en forma completa, considerando una mayor cantidad de integrantes de la comunidad, permitiendo analizar la diversidad y los posibles cambios de la misma, frente a las variaciones externas.

Relaciones entre los microorganismos y las especies vegetales

Diversas interacciones entre plantas y microorganismos son conocidas ampliamente y han sido objeto de estudio de diversas disciplinas. Las plantas son productores primarios de energía y por lo tanto, la base de todas las cadenas tróficas. Todos los órganos de las plantas son susceptibles a ser colonizados por otros seres vivos que necesitan de las mismas para su alimentación. Las plantas son atacadas no sólo por insectos fitófagos y nemátodos, sino también por bacterias y hongos fitopatógenos. Las bacterias patogénicas en general, actúan como oportunistas, invadiendo tejidos dañados o “heridas” ó a través de aberturas naturales, como los estomas. Los hongos poseen en cambio, un equipo enzimático capaz de dañar la pared celular de celulosa y entrar en contacto directo con los protoplastos vegetales. El resultado de estas infecciones, desencadena las enfermedades que son manifestadas mediante síntomas y/o signos, como por ejemplo, clorosis, necrosis, marchitamiento, presencia de esporas, entre otras. Pero no todas las interacciones entre plantas y microorganismos son de tipo patógenas. Existen otro tipo de interacciones que van desde la patogénesis hasta el mutualismo (Douglas, 2010).

Si bien la susceptibilidad de los órganos vegetales a interactuar con otros organismos es amplia, las interacciones más importantes se dan a nivel de las raíces y han fundamentado los estudios más profundos sobre las interacciones benéficas planta-microorganismo que

ocurren espontáneamente en la naturaleza: asociaciones con hongos micorrízico-arbusculares (HMA) y bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (BFN) son claros ejemplos de ello.

Dependiendo de la especie de hongo y la especie vegetal, existen dos grandes grupos de asociaciones micorrízicas: Asociaciones endomicorrízicas, caracterizadas por micelio intercelular y asociaciones ectomicorrízicas, donde los hongos forman micelio externo, limitándose solo a las células corticales (Bolan, 1991). El 90% de las plantas terrestres son susceptibles a formar asociaciones simbióticas con HMA (Bonfante y Perotto, 1995). Este tipo de asociaciones simbióticas, incrementan la movilización de nutrientes hacia la planta, especialmente el P (Bolan, 1991).

La familia de las leguminosas presenta un tipo de asociación simbiótica muy específica con ciertos géneros de bacterias de la familia *Rhizobiaceae*. Sin embargo, esta actividad fijadora puede ser llevada a cabo por otros organismos como las Cyanobacterias, *Actinomicetes*, diazotrofos del género *Azospirillum*, entre otros (Alexander, 1984). Estos organismos tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico de forma libre, en el suelo, sin la necesidad de la formación de un órgano simbiótico ó nódulo. Esta característica de fijación libre, intenta suplir la fijación de nitrógeno en plantas que no pertenecen a la familia de las leguminosas.

Tanto las interacciones de plantas con HMA y BFN presentan un beneficio para el hospedantes, de carácter nutricional, mientras que la planta brinda a los microorganismos, los sustratos carbonados y la protección frente a los factores adversos del ambiente del suelo. Pero existen otros ejemplos que también denotan que los beneficios obtenidos por ambas partes, no se limitan solamente a peculiaridades nutricionales. Otro de los beneficios que pueden brindar algunos microorganismos es la producción de hormonas de crecimiento, como Ácido Indol Acético (AIA) (Ribaudó y col., 2006). Esta característica ha entusiasmado aún más la búsqueda de organismos con capacidad de promoción de crecimiento vegetal y el potencial uso de estos organismos como biofertilizantes, “amigables” con el medio ambiente, ya que reemplazan en parte el uso de agroquímicos. Asimismo, pueden ocurrir efectos sinérgicos cuando se combinan más de un organismo, en el afán de obtener beneficios directos sobre la producción agrícola. Un ejemplo de ello es la promoción de la germinación en semillas de maíz y soja, cuando se inoculan

Bradyrhizobium japonicum en combinación con *Azospirillum brasilense* (Cassán y col., 2009).

Estas complejas interacciones entre comunidades microbianas y las plantas, sumadas a la influencia de los factores ambientales y antrópicos que pueden modificar el ecosistema y sus características, de forma temporal ó definitiva, determinan a su vez, la necesidad de realizar evaluaciones constantes de la biodiversidad en aquellos ambientes que son sometidos a actividades productivas intensivas ó presentan características particulares de vulnerabilidad.

Si bien, a lo largo de los años, se han registrado diversos estudios acerca de las características edáficas de los ecosistemas de la Pampa Deprimida y sus relaciones con los procesos geomorficos y la vegetación acompañante (Leon, 1975; Burkart, 2005; Pelerman, 2001), los antecedentes de estudios relacionados a los microorganismos que habitan el ambiente edáfico de la Pampa Deprimida, son limitados. Más aún, la información acerca de las bacterias relacionados con las especies naturalizadas y cultivadas del género *Lotus* se limitan a bacterias fijadoras de Nitrógeno (Estrella y col., 2009) y solubilizadoras de fosfato (Castagno y col., 2011). Por otro lado, los antecedentes acerca de los microorganismos fúngicos se limita a los HMA (Sannazzaro y col., 2004), y estudios acerca de la interacción entre las especies del género *Festuca* y endofitos del género *Neothypodium* (Gundel y col., 2009).

Por tal motivo, el **Objetivo General** del presente trabajo de tesis, es incrementar el conocimiento acerca de los microorganismos que habitan el ambiente edáfico en los ecosistemas de la Pampa Deprimida del Río Salado (Buenos Aires, Argentina).

Para ello se plantean 4 capítulos de resultados experimentales. Los dos primeros están orientados a establecer el efecto de la introducción de *L. tenuis* en el ecosistema sobre las comunidades de bacterias y hongos, luego del cultivo continuo de la leguminosa, a través del uso de herbicidas. Asimismo, establecer las variables edáficas que determinan la distribución de la mycobiota, en las condiciones edáficas marginales. El tercer capítulo, tiene por objetivo, caracterizar a los organismos fúngicos que habitan la endorizosfera de las especies que crecen sobre los suelos de la Pampa Deprimida, en cuanto a sus capacidades de tolerancia y posibles efectos benéficos nutricionales para la planta. Finalmente, el cuarto capítulo tiene por objeto el estudio de la interacción asintomática entre organismos endofitos, no micorrizicos, con plantas del género *Lotus* y caracterizar el efecto

de las mismas con metodologías que permitan incrementar el espectro de información acerca de los efectos resultantes de la relación entre el endofito y la leguminosa.

Capítulo 1

**Caracterización de la comunidad bacteriana de los suelos de la
Pampa Deprimida, bajo el efecto de la práctica de promoción de
*Lotus tenuis***

Promoción de *Lotus tenuis*

La promoción de pasturas es una práctica agrícola ampliamente difundida a nivel mundial. Es aplicada en diversos ecosistemas (Lamoureaux y Boudort, 2007; Kehui y col., 2007, Thom y col., 1993) y se ha incrementado en los últimos 25 años (McCornick y col. 2014). El objetivo de esta práctica es la remoción de la vegetación nativa y/o naturalizada mediante el uso de herbicidas, con el propósito de eliminar la competencia en los primeros estadios de crecimiento de alguna especie de particular interés. La práctica de promoción de *L. tenuis* fue diseñada y ha sido evaluada experimentalmente por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), seccional Cuenca del Salado, en la Chacra Experimental Manantiales, Chascomús, Buenos Aires. Los resultados de esta práctica a través de los años fueron exitosos con respecto a la eficiencia en la remoción de la vegetación competitiva y un aumento en la acumulación de biomasa de *L. tenuis* (Bailleres y Sarena, 2009). Asimismo, el proceso fue acompañado con una mejora en la calidad de los suelos. Sin embargo, nunca se realizaron estudios de la biodiversidad microbiana acompañante.

Por otra parte, existe bibliografía que respalda el efecto negativo de la aplicación de agroquímicos sobre el suelo en ciertas comunidades de organismos, como las bacterias oxidantes del amonio (Feld y col. 2015). En otros trabajos, se reportan cambios sólo con la aplicación de dosis elevadas de algunos herbicidas como 2-4D, picloram y glifosato (Wardle y Parkinson, 1990) ó la reducción de actividades metabólicas específicas, como por ejemplo la actividad fosfatasa (Perucci y col., 1999). Cabe destacar, que en este tipo de experimentos la aplicación de los herbicidas se realizó en forma directa, en altas dosis y sobre microcosmos artificiales, bajo condiciones controladas de invernadero. Estas condiciones experimentales podrían diferir de aquellas que ocurren en la naturaleza, donde las características ambientales son muy variables y poseen significativa influencia no sólo sobre la comunidad de microorganismos del suelo, sino también sobre la microfauna, macrofauna y especies vegetales que forman parte del ecosistema. También es oportuno aclarar, que las prácticas agrícolas que tienen como metodología la aplicación de herbicidas, tienen por objeto la remoción de malezas y por lo tanto se fundamentan en aplicaciones de dosis apropiadas para las especies vegetales que ejercen la competencia por los recursos y no en forma directa sobre el suelo. La importancia del impacto de los cambios ejercidos por la práctica, está dada por su efecto sobre la comunidad vegetal que habita los suelos y no por modificaciones generadas por la aplicación directa del herbicida en el suelo.

Influencia de las especies vegetales sobre el ecosistema suelo

Resulta de vital importancia ecológica, evaluar el impacto que provoca el cambio en la composición florística, sobre las comunidades de microorganismos que habitan en el ambiente edáfico. Como es sabido, las especies vegetales realizan un aporte importante al suelo mediante los restos orgánicos que depositan sobre el mismo y también mediante los exudados radicales, cuya composición varía notablemente entre las diferentes especies. Las leguminosas producen, entre otros compuestos, sustancias de gran importancia biológica, como mensajeros químicos, que median y regulan los pasos iniciales de la interacción con rizobacterias de la familia *Rhizobiaceae*. Además, es reconocida la producción de sustancias tóxicas para otros individuos de la misma especie, fenómeno conocido como alelopatía. En definitiva, es importante tener en cuenta que un cambio en la composición florística, podría implicar un cambio significativo en los sustratos disponibles para las actividades enzimáticas de los microorganismos. Es importante resaltar también, que además de las modificaciones en la cantidad y calidad de los exudados radicales, existen parámetros físicos, propios del suelo, que podrían verse modificados por un cambio en la vegetación. Las raíces de las monocotiledóneas poseen una morfología que les permite explorar los primeros 15 cm de la profundidad del suelo, lo que las diferencia de las raíces de las dicotiledóneas, las que, debido también a su morfología radicular característica, pueden explorar varios metros en la profundidad en los suelos, modificando parámetros físicos como la tasa de infiltración y la permeabilidad. Es por ello, que inferimos que el cambio de una comunidad de pradera de gramíneas, como la que caracteriza a los ecosistemas de la Pampa Deprimida, por una especie leguminosa promovida a través de años sucesivos como monocultivo, podría traer aparejado cambios en las tasas de infiltración, permeabilidad, ciclado de nutrientes y estructuración del suelo. Estas modificaciones se suman al aporte de nitrógeno que la leguminosa genera gracias a la simbiosis con sus bacterias específicas, generando la posibilidad de modificar el ambiente edáfico.

Plataformas de secuenciación masiva

Existen diferentes plataformas tecnológicas de NGS, con diferentes características y costos. La tecnología 454 es una plataforma de secuenciación masiva, comercializada por la compañía *Roche*. Esta estrategia de secuenciación está fundamentada en la detección por quimioluminiscencia del pirofosfato liberado cuando se produce la incorporación de un

nucleótido, en la etapa de elongación de la cadena complementaria del ADN. La utilización de la tecnología 454 de Roche, requiere una preparación particular del material genómico que se pretende secuenciar. Para el estudio de comunidades microbianas, el material a secuenciar corresponde a los fragmentos de secuencias obtenidos a partir de una reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction* (PCR). La región a amplificar mediante PCR depende de la comunidad que se pretende analizar. Por lo general se trata de fragmentos del gen ribosomal 16S y 18S, para la identificación de bacterias y hongos, respectivamente. Debido a que el análisis de comunidades se realiza mediante la secuenciaciones de los fragmentos denominados “amplicones”, la técnica también es denominada *Amplicon Sequencing*.

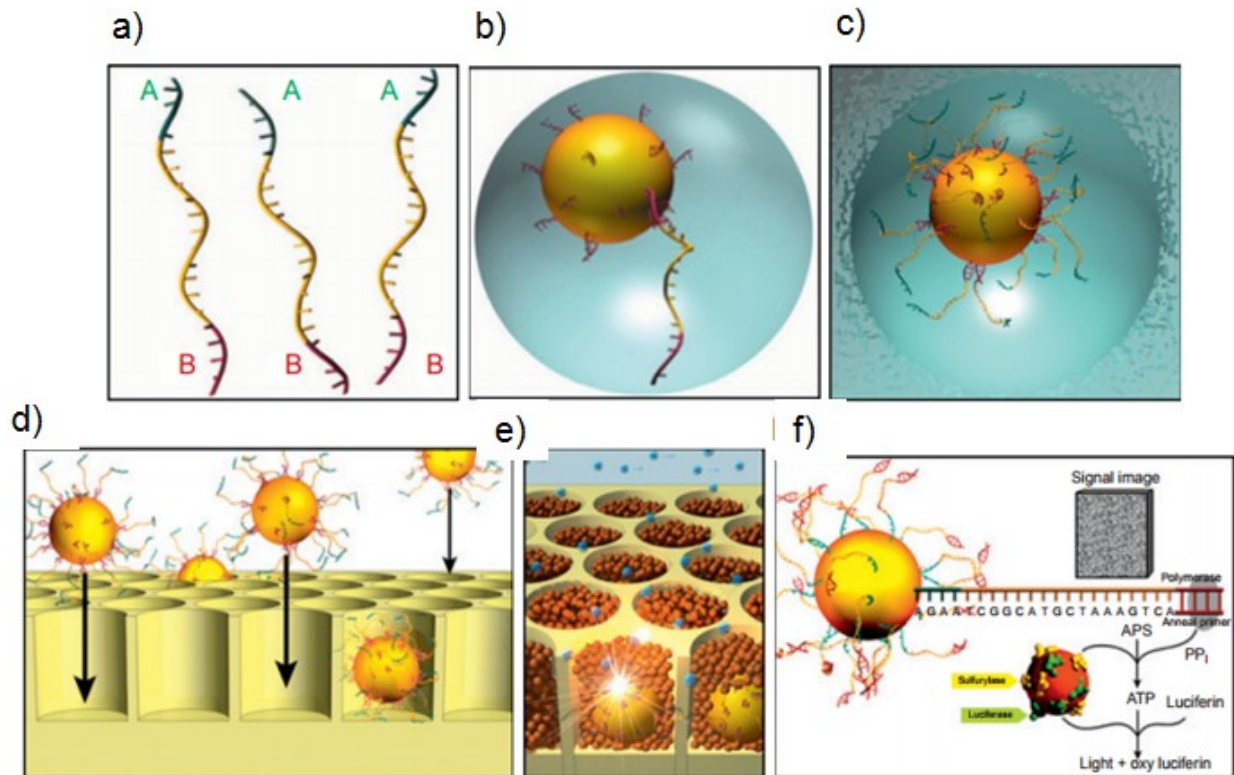
Luego de la obtención y purificación del material que se pretende secuenciar, debe realizarse una estandarización del material genómico, para asegurar una correcta estimación de la comunidad. Cada fragmento a amplificar requiere de la incorporación de un par de secuencias cortas denominadas “adaptadores”. Los adaptadores se adhieren a ambos extremos de cada uno de los amplicones que serán secuenciados posteriormente (Figura N° 1.1.a). Mediante uno de los adaptadores, cada hebra de ADN se adhiere a una nano-partícula esférica (Figura N° 1.1.b). Posteriormente, se genera una emulsión, donde se produce una PCR para generar varias copias de cada una de las hebras incorporadas anteriormente a la nanopartícula. En la PCR en emulsión se genera un complejo para encapsular el ADN (unido a la nano-esfera) en micropartículas micelares (Figura N° 1.1.b). Dentro de cada una de estas micelas, se produce la PCR. De esta manera, luego de la amplificación, cada nano-esfera queda recubierta por miles de copias de la misma secuencia. (Figura N° 1.1.c)

Las esferas resultantes, son colocadas en una placa de titanio con múltiples pocillos, dentro de los cuales se deposita una única esfera de reacción (Figura N° 1.1 d y e). La elongación de la cadena de ADN libera un pirofosfato, cada vez que se agrega un nucleótido al filamento. La molécula de pirofosfato actúa como sustrato para la enzima ATP sulfúrilasa. Esta enzima ayuda a la formación de ATP. El ATP posibilita la emisión de luz por parte de la luciferasa. La intensidad de luz es cuantificada y representada en un cromatograma.

Como resultado de la utilización de estas técnicas, se obtiene un caudal de información que debe ser analizado de manera computacional. Mediante la utilización de herramientas bioinformáticas, tales como alineamiento y agrupamiento de secuencias; y ecológicas, tales

como métricas de diversidad y análisis de ordenamiento, es posible comparar comunidades microbianas a lo largo de gradientes ambientales (Zhang y col., 2012).

Figura N° 1.1. Etapas de la técnica de pirosecuenciación 454-Roche. (Extraído de Purdy y col., 2010).



Unidad taxonómica: “OTU”

En el estudio de comunidades microbianas en muestras ambientales, la unidad utilizada para definir a una especie es la Unidad Taxonómica Operativa, del inglés *Operational Taxonomic Unit* (OTU). Si la agrupación de las secuencias en OTUs es realizada a un 97% de similitud, se considera que este OTU representa a una única especie de microorganismo. Dicho de otro modo, el valor de 3% de disimilitud entre dos secuencias es considerado suficiente para diferenciar dos organismos a nivel de especie.

Análisis de los resultados obtenidos a través de tecnologías de NGS

Como producto de la utilización de técnicas de NGS, se obtiene una cantidad importante de información que requiere de un procesamiento con herramientas bioinformáticas y estadísticas, en el marco de ciertos conceptos ecológicos.

En primera instancia debe realizarse el procesamiento referente a las secuencias. La plataforma 454, genera como resultado del proceso de secuenciación un alto número de amplicones, que presentan además de la región de interés, los adaptadores y las etiquetas identificadoras de cada muestra.

Luego de la eliminación de quimeras y filtrados de calidad de las secuencias (para que la información obtenida sea lo más precisa posible), se procede a la agrupación de las mismas en OTUs, que representarán los individuos sobre los cuales se realizarán los análisis de diversidad.

La identidad taxonómica de las secuencias es obtenida por la comparación de las mismas contra una base de datos previamente generada (a partir de la información recopilada a través de los años), en los bancos de datos de información genómica. Las bases de datos son actualizadas periódicamente y depuradas para garantizar que la información brindada sea confiable. Sin embargo, es inevitable que estos recursos de información sean incompletos y con errores. Por lo tanto, es importante contar con las versiones lo más actualizadas posibles y herramientas, que restrinjan la comparación de la manera necesaria, para disminuir los posibles errores en la asignación taxonómica.

Es importante destacar la complejidad de la información pertinente en cada paso del análisis. En diferentes etapas, desde el momento de la recolección de la muestra, hasta la formulación de las conclusiones, se aplican filtros o restricciones para garantizar que la información final sea lo más precisa posible y extrapolable a la comunidad que se pretende representar con las muestras analizadas. Si bien, la principal ventaja de la utilización de estas técnicas se basa principalmente en la cantidad de datos obtenidos en un tiempo relativamente corto, existe pérdida de información, sesgos y la posibilidad de sobreestimación y subestimación. Por tal motivo, es imprescindible un tratamiento estadístico estricto, que incluye tanto la estandarización y normalización de los datos, como así también la utilización de herramientas estadísticas multivariadas.

Una forma de visualizar el efecto del tamaño muestral en los análisis, es a través de la generación de curvas de rarefacción. Estas curvas manifiestan el esfuerzo de muestreo sobre la diversidad representada por cada muestra, e indican el nivel de cobertura del análisis sobre el total de la diversidad de la comunidad. De aquí surge la necesidad de igualar los tamaños muestrales ó estandarizar, para que las distintas muestras puedan ser comparables entre sí. En algunos casos, la utilización de métodos paramétricos exige además, la transformación de los datos obtenidos en alguna distribución acorde al modelo requerido. La necesidad de nuevas estimaciones estadísticas ha llevado a que muchas herramientas bioinformáticas destinadas al análisis del campo de la ecología microbiana, se hayan perfeccionado a través de los años y en algunos casos, han acompañado el desarrollo y perfeccionamiento de las plataformas de secuenciación.

El análisis de diversidad es realizado a través del cálculo de índices y métricas, sobre la tabla de OTUs, generada en las etapas previas. La diversidad puede ser medida intrínsecamente, mediante índices, para conocer la riqueza y la distribución de los OTUs que forman parte de una muestra (diversidad alfa). Además es posible comparar comunidades a través de métricas de distancia y establecer el grado de similitud o disimilitud entre las comunidades, en base a la información génica (diversidad beta).

Mediante la utilización de pruebas estadísticas multivariadas, es posible establecer diferencias significativas entre comunidades, sujetas a diferentes tratamientos. Aquí es donde la secuenciación masiva del material genómico cobra importancia como herramienta para la caracterización de comunidades. Diferentes pruebas pueden ser utilizadas con la condición de presentar el carácter permutacional en su ejecución. Debido a la naturaleza de los datos resultantes, expresados en forma de matriz de OTUs, existe una sobreestimación de los OTUs más abundantes sobre los menos abundantes. Por tal motivo, es necesario el análisis exhaustivo basado en transformaciones de datos, previos a la utilización de la prueba estadística, sea ésta paramétrica o no paramétrica. Diversos paquetes estadísticos ofrecen el test permutacional de la varianza (PERMANOVA), siendo este uno de los más aceptados y utilizados para el tratamiento de datos de NGS.

La presentación de la información obtenida, en lo que se refiere a diversidad, es expuesta a través de ordenamientos basados en Análisis de Coordenadas Principales, del inglés *Principal Coordinates Analysis* (PCoA) ó Escalamiento Multidimensional No Métrico, del inglés *Non-Metric Multidimensional Scaling* (NMDS).

Debido a la cantidad de información referente a la taxonomía, es posible la visualización de patrones a través de recursos gráficos que abarquen un gran caudal de información, como por ejemplo gráficos de calor, del inglés *heatmap*. Otras alternativas como los gráficos de torta, barra, cajas, colapsando OTUs a diferentes niveles taxonómicos son igualmente válidas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que a medida de que se avanza en la categoría taxonómica, desde Reino hasta llegar a especie, la información obtenida tiende a ser menos precisa. Por ello es imprescindible considerar que un OTU es una identidad taxonómica, que difiere en un 3% del resto de los OTUs y representa a una sola especie en el análisis, lo que no implica que necesariamente dos OTUs con la misma asignación taxonómica representen al mismo organismo. La falta de información en las bases de datos, los pasos previos a la asignación taxonómica y el posible sesgo de los métodos de extracción del material genómico utilizados, pueden interferir en la verdadera identidad de las secuencias analizadas. A pesar de esto, la cantidad de información obtenida al final del proceso, supera ampliamente todas estas limitaciones.

Importancia de la información taxonómica

El conocimiento de los grupos taxonómicos presentes, da una idea de los procesos biológicos que gobiernan un determinado ambiente. Esta información está basada en el conocimiento de los procesos realizados por los microorganismos, en especial aquellos no cultivables en condiciones *in-vitro*. Sin embargo, gracias a la información obtenida durante el periodo en el que las técnicas moleculares tuvieron alcance hasta los organismos no cultivables, es posible realizar ciertas inferencias sobre los procesos relacionados a los mismos. Las correlaciones entre factores ambientales que tienen influencia sobre ciertos grupos taxonómicos, da una idea de las preferencias de los integrantes de dicho grupo sobre ciertas condiciones y permite estimar su comportamiento.

Por otro lado, el estudio de la comunidad de microorganismos de una muestra, tiene importancia para conocer la variabilidad de la comunidad frente a adversidades ambientales. Un concepto de comunidad “modelo” es el definido por el “microbioma núcleo”, del inglés *core microbiome*. Una comunidad *core* está definida como aquella comunidad que está presente en un determinado ecosistema y tiene la capacidad de resistencia y/o resiliencia frente a disturbios ambientales (Shade y Handelsman, 2012) y está representada por los organismos presentes en al menos el 90% de las muestras individuales (Pose-Juan y col., 2017; Kellogg y col., 2017). Ésta comunidad no sólo es la representante global del

ecosistema, sino que también es la responsable del funcionamiento del mismo, ya que su participación biológica tiene mayor impacto que el resto de los microorganismos que integran la comunidad.

En el presente capítulo, mediante el uso de tecnologías de secuenciación masiva en muestras de ADN extraído de los suelos se analizó el efecto de la práctica de promoción de *L. tenuis* aplicada de manera continua, sobre la comunidad bacteriana de los suelos de la Pampa Deprimida.

Hipótesis

La práctica de promoción de *L. tenuis* (mediada por herbicidas) tiene efectos sobre la estructura de las comunidades de bacterias de los suelos en la Pampa Deprimida, manifestado en cambios en los índices de diversidad alfa y beta.

Objetivos

1. Evaluar a nivel global, mediante técnicas moleculares de secuenciación de alto rendimiento, la estructura de las comunidades de bacterias que habitan los suelos de Pampa Deprimida, luego de someterse a sucesivos años de la práctica de promoción de *L. tenuis*.
2. Determinar si existen modificaciones en la estructura de las comunidades luego de un periodo de 5-6 años de ejecución de esta práctica.
3. Determinar cuáles son los grupos taxonómicos presentes en estos ecosistemas.

Materiales y Métodos

Sitios de estudio

Para el estudio de comunidades, tanto bacterianas como fúngicas, se tomaron muestras de suelo de tres sitios representativos de la Pampa Deprimida: Manantiales 1, La Bellaca y Manantiales 2 (Figura N° 1.2). En cada uno de estos sitios se presentaban las dos condiciones contrastantes evaluadas:

- a) Suelos en condiciones naturales
- b) Suelos bajo el efecto de la práctica de promoción de *L. tenuis*.

Los sitios “Manantiales 1” y “Manantiales 2” se localizan dentro de la *Chacra Experimental Integrada Manantiales*, perteneciente al INTA seccional Cuenca del Salado y al Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires. Ambos sitios distan de aproximadamente 1 km de distancia. El sitio “La Bellaca”, se encuentra aproximadamente a 20 km de los anteriores y pertenece a un productor independiente. Dentro de cada sitio, se contaba con la presencia de al menos tres lotes, lo cuales tenían un área de aproximadamente 1000 metros cuadrados.

Se decidió realizar el análisis en tres sitios, con el objetivo de disminuir los posibles efectos causados por la heterogeneidad espacial, propia del suelo y evitar estimaciones erróneas acerca de la diversidad microbiana del ambiente estudiado. La característica de incrementar los sitios estudiados, corresponde con las recomendaciones propuestas por el equipo de Genómica y Bioinformática del INDEAR (Rosario, Buenos Aires), donde se realizó el secuenciamiento. También, se consideró como condición necesaria, que los sitios evaluados posean al menos 5 años sucesivos de aplicación de la práctica de promoción de *L. tenuis*, como así también, el control de que dicha práctica se realizó bajo la supervisión del grupo perteneciente al INTA Seccional Cuenca del Salado, quién lleva a cabo el estudio de la misma, de manera comparativa con los lotes correspondientes al pastizal natural, considerados como tratamiento en esta tesis.

En el momento de la colecta de las muestras, se tuvo la precaución de tomar las mismas respetando que el tipo de suelo corresponda a la clase *Natraquoll*. Para ello se evitaron las zonas de bajos alcalinos, con la presencia de especies indicadoras de tal condición, como por ejemplo *Solanum glaucophyllum*.

a) Lotes en condiciones de pastizal natural

Los suelos en condiciones naturales, presentaban como vegetación característica una estepa de gramíneas, correspondientes a la fitogeografía típica de la región. La composición florística fue representada principalmente por especies tales como *Festuca arundinacea*, *Lolium multiflorum*, *Ambrosia tenuifolia*, *Sporobolus indicus*, *Paspalum vaginatum*, *Distichlis spicata* y algunos individuos de *L. tenuis* aislados, como consecuencia de su naturalización a través de los años. Los lotes evaluados se encontraban en condiciones naturales, sin uso agrícola por un periodo de aproximadamente 20 años.

b) Tratamiento con herbicidas en los lotes promovidos

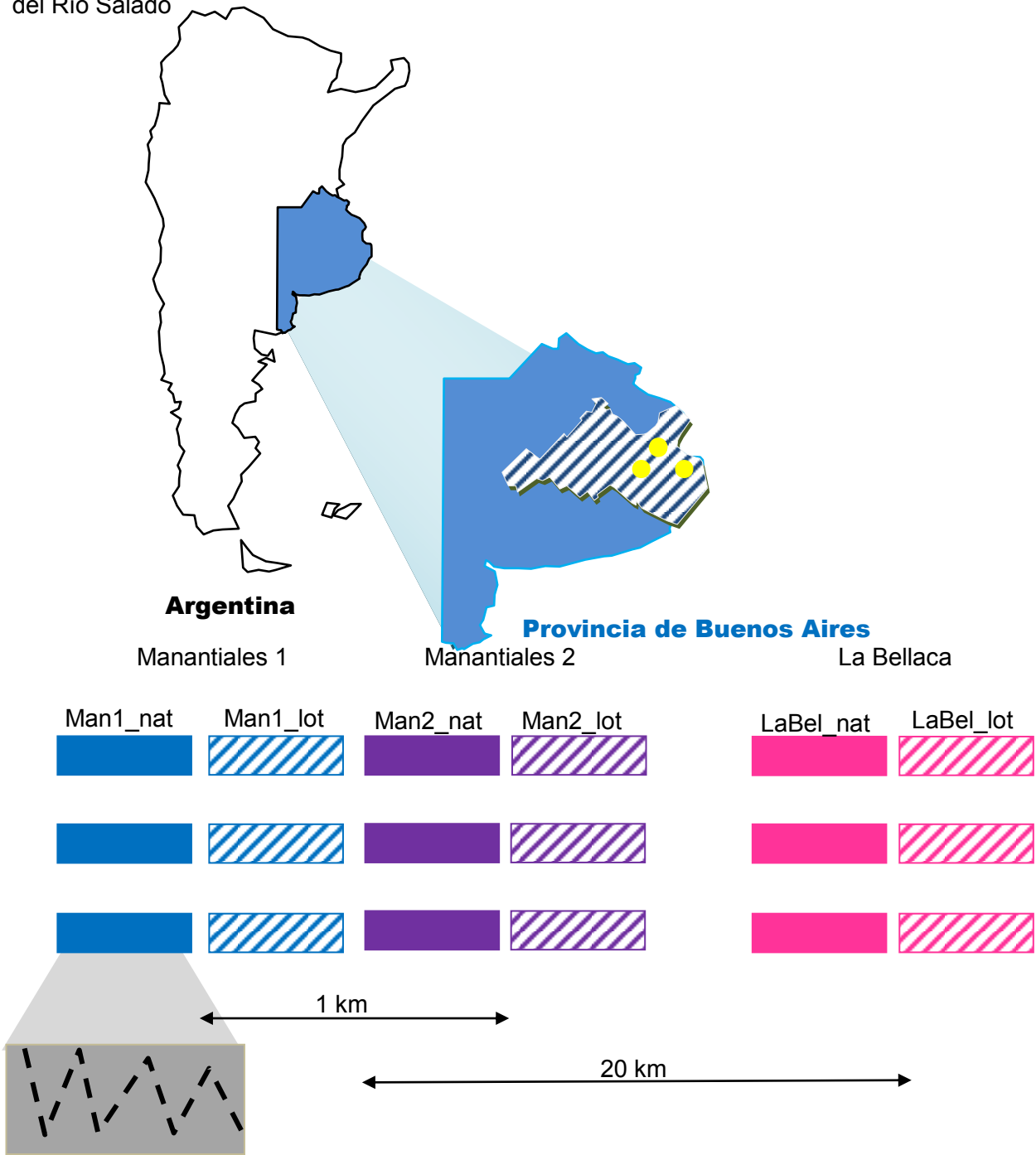
La práctica de promoción de *L. tenuis* fue llevada a cabo mediante la aplicación de herbicidas sobre las pasturas que crecen en condiciones naturales.

Los productos y dosis aplicadas fueron los siguientes:

- * 1 aplicación anual de N-fosfometil-glicina (Glifosato) en una dosis de 3,5 L/ha, realizada a fines de Junio.
- * 2 aplicaciones anuales de 2,4-ácido diclorofenoxi butírico (2,4 DB) en una dosis de 1 L/ha.
- * 1 aplicación de Etil(R)-2-[4-(6-cloro-2-quinoxaliloxi)fenoxil]propionato (Quizalofop-p-etil), en una dosis de 1.2 L/ha.

Al momento de la colecta de las muestras, los sitios promovidos presentaban un historial de 5-6 años consecutivos con la aplicación de esta práctica. Como consecuencia de este tipo de manejo, la vegetación dominante de estos lotes fue *L. tenuis*.

Figura N° 1.2: Diagrama de sitios de estudio, ubicados en el área de la Pampa Deprimida del Río Salado



Recolección de muestras, acondicionamiento y extracción del material genómico

Las muestras fueron tomadas en el mes de noviembre del año 2013. La extracción se realizó con un barreno, directamente sobre el suelo, tomando los primeros 20 cm de profundidad.

Por cada lote, representante de un sitio-uso del suelo, se tomaron 3 muestras biológicas. Cada una de estas muestras biológicas, consistía en un pool de 20 sub-muestras, tomadas cada 10 metros de distancia (Figura N° 1.2).

Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas y llevadas al laboratorio, donde se conservaron a 4°C hasta el momento de la extracción de ADN.

Cada pool (de 20 submuestras), fue homogeneizado manualmente y tamizado a través de un tamiz de 2mm de diámetro de poro. Este grupo de 20 submuestras homogeneizadas constituyó una muestra biológica. La extracción del material genómico se realizó a partir de una alícuota de 0.5 gr de suelo homogeneizado y la utilización del kit comercial *Power Soil ADN isolation kit* (MOBIO).

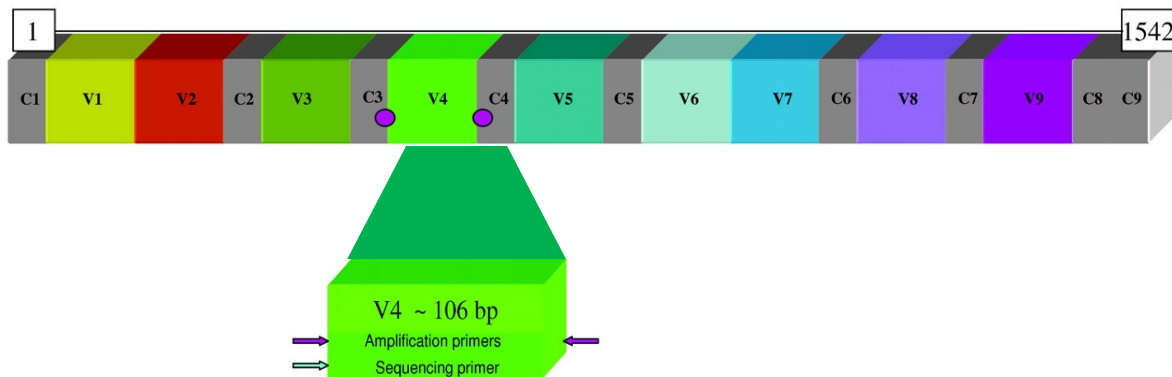
La concentración e integridad del material genómico fue evaluada a través de espectrofotometría (Synergy TM H1, BIOTEK) y electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Preparación de las librerías de amplicones

Las librerías de amplicones y el secuenciamiento fueron realizados por la Unidad de Genómica y Bioinformática del Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR).

Las librerías fueron preparadas amplificando la región V4 del gen ribosómico 16S (Figura N° 1.3). Esta región ha sido propuesta por el *Ribosomal Database Project* para análisis de diversidad utilizando la tecnología 454-Roche (Olsen y col. 1992). Para la amplificación de la región se utilizaron los siguientes cebadores universales: 515F: 5'-CTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' y 806R: 5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'.

Figura N° 1.3. Región V4 del gen ribosómico 16s. (Adaptado de Petrosino y col. 2009).



Posteriormente se realizó una re-amplificación para incluir los adaptadores *ROCHE-454* “A” y “B”, de acuerdo a las especificaciones de la tecnología de secuenciación utilizada. En este paso, también se incluyeron los nucleótidos identificadores, del inglés *Multiple Identifiers* (MIDs) para posibilitar la clasificación de las muestras durante el análisis bioinformático de las secuencias.

Demultiplexado de las secuencias y filtrado por calidad

El análisis de las secuencias se realizó con el Software “*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*” (QIIME), desarrollado por Caporaso y colaboradores (2010). Se utilizaron las versiones 1.7.0, 1.8.0 y 1.9.0 del software.

Debido a que durante el proceso de secuenciación mediante la tecnología 454, todos los amplicones son secuenciados de forma simultánea, el resultado o salida del secuenciador consiste en un único archivo, con formato “.sff”, que contiene todas las secuencias del estudio. Por tal motivo, es necesario separar estos grupos de secuencias por muestra. Este proceso se denomina “demultiplexado”. En primera instancia, se realizó el demultiplexado de las secuencias y filtrado por calidad, mediante el script *split_libraries.py* de QIIME. En este paso, también se eliminaron las quimeras y aquellas secuencias que no cumplían con las especificaciones dadas como parámetros restrictivos en el archivo de calidad.

Agrupación de las secuencias en OTUs

Las secuencias fueron agrupadas en OTUs, considerando el 97% de similitud. Es decir que aquellas secuencias similares en al menos un 97% ó disimiles en no más de un 3% fueron

agrupadas mediante el script *pick_otus.py* de QIIME y con el uso del algoritmo Uclust (Edgar y col. 2010) con un argumento de 0.97 (similitud).

Elección de la secuencia representante

La secuencia más abundante de cada grupo de OTUs fue elegida como la representante de cada grupo. De este modo, esta secuencia es la seleccionada para ser comparada con la base de datos que contiene la información taxonómica.

Alineamiento de las secuencias y asignación taxonómica

Las secuencias representantes fueron alineadas mediante el algoritmo *Python Nearest Alignment Space Termination*: PyNAST (Caporaso y col. 2010) y el script *align_seqs.py* de QIIME. La identidad taxonómica de cada OTU fue asignada para cada representante mediante el algoritmo clasificador RDP y la base de datos *Greengenes database update* versión 2012 (McDonald y col. 2012). Se utilizó un nivel de confianza de 0.5 es decir que para que pueda asignarse una identidad taxonómica a una secuencia representante, esta debía presentar una similitud de al menos un 50% con respecto a la secuencia de la base de datos, de identidad taxonómica conocida. Este paso se realizó mediante el script *assign_taxonomy.py* de QIIME.

Generación de la tabla de OTUs

Los datos obtenidos en los pasos anteriores fueron sintetizados en una matriz ó tabla de OTUs, del inglés *OTU table*, generada mediante es script *make_otu_table.py* de QIIME. Dicha tabla contiene la siguiente información:

- N° ID de cada OTU.
- Número de lecturas ó secuencias correspondientes a cada OTU por muestra analizada.
- Asignación taxonómica de cada OTU, de acuerdo con la base de datos *Greengenes*.

La información contenida en una tabla de OTUs típica, se muestra como ejemplo en la Tabla N° 1.1

Se eliminaron aquellos OTUs que fueron clasificados taxonómicamente como “*Unassigned*”, ya que no correspondían a ninguna identidad taxonómica bacteriana y podrían formar parte de errores en el proceso de secuenciación ó contaminaciones.

Tabla N° 1.1. Modelo de tabla de OTUs, formada a partir del análisis de secuencias generadas por secuenciación masiva.

# OTU ID	Muestra 1	Muestra 2	...	Muestra n	taxonomy
denovo0	23	343	1	287	k__Bacteria p__Proteobacteria c__Deltaproteobacteria o__Syntrophobacterales f__Syntrophobacteraceae g__Syntrophobacter s__
denovo1	345	9	33	462	k__Bacteria p__Acidobacteria c__Acidobacteria-6 o__iii1-15 f__ g__ s__
denovo2	56	1	296	2	k__Bacteriap p__

Estandarización y transformación

Para los análisis posteriores, tanto de diversidad como taxonómicos, la tabla de OTUs fue, en primera instancia, relativizada. La relativización se realizó sobre el total de secuencias de la muestra que presentó el menor registro de lecturas. Esta relativización fue realizada para evitar sesgos en la estimación de los índices de diversidad, debidos a la diferencia en el número de secuencias obtenidas en cada muestra.

En segunda instancia, se realizó la transformación de los valores estandarizados previamente. La transformación de los valores fue realizada mediante la transformación de Hellinger (Legendre y Gallagher, 2001) con la utilización del paquete estadístico para análisis de ecología de comunidades *Vegan* del software R (Oksanen y col. 2012). De esta manera, los valores de lecturas para cada OTU por muestra fueron llevados a una distribución normal.

Generación de las curvas de rarefacción

Las curvas de rarefacción del número de OTUs observadas vs el número de secuencias obtenidas, fueron generadas con el software PAST 3.06 (Hammer y col. 2001).

Análisis de Diversidad

El estudio de diversidad tuvo por objetivo caracterizar a la comunidad en cuanto a sus propiedades intrínsecas (Diversidad Alfa) y comparar la estructura de las mismas (Diversidad Beta).

Diversidad alfa

Para determinar las propiedades intrínsecas de las comunidades de bacterias de los suelos de la Pampa Deprimida, se realizó el análisis de diversidad alfa, considerando los siguientes índices:

- * Diversidad de Shannon. Considera la riqueza específica de la muestra y equitatividad.

$$H' = \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Donde:

S= Número de especies.

p_i = Proporción de individuos por especie = n_i/N

n_i = Número de individuos de la especie i .

N= Número de todos los individuos de todas las especies.

- * Simpson. Indica el grado de dominancia ejercida por algunos miembros de la comunidad. Es una medida de la equitatividad de la comunidad.

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Donde:

S= Número de especies.

N= Total de organismos presentes.

n = Número de ejemplares por especie.

- * Chao1. Es un estimador no-paramétrico que evalúa la variación de la diversidad de la muestra dada por la presencia de los organismos menos abundantes.

$$\text{Chao 1} = \frac{S + a^2}{2b}$$

Donde:

S= Número de especies.

a= Número de especies que están representadas por un solo individuo.

b= Número de especies representadas por dos individuos.

Mediante el análisis de estos índices de diversidad alfa, es posible caracterizar no sólo la riqueza específica de cada comunidad sino también su estructura, determinando la presencia de OTUs que puedan ejercer la dominancia y del mismo modo la participación de OTUs que se encuentran en baja proporción con respecto al total. Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados, se utilizó la prueba estadística multivariada *Hotelling paired test*, para muestras pareadas, tomando como variables, cada uno de los índices de diversidad alfa calculados previamente y como factores los tratamientos “Promoción de *L. tenuis*” y “Pastizal natural”.

Diversidad Beta

Para determinar el grado de reemplazo entre las comunidades se computaron las siguientes matrices de distancia:

- * Bray-Curtis. Considera la presencia-ausencia de cada OTU y además su abundancia. Al considerar la abundancia, le da mayor importancia a los OTUs que se encuentran en mayor proporción.

$$BC_{ij} = 1 - \frac{2C_{ij}}{S_i + S_j}$$

Donde:

C_{ij} : Suma del número de especies comunes a ambas comunidades.

S_i y S_j : Número total de especies en los sitios i y j .

- * Jaccard. Considera presencia-ausencia de cada OTU. Al no considerar abundancia, le da mayor importancia a los OTUs que se encuentran en menor proporción.

$$IJ = c/(a+b+c)$$

Donde:

a: Número de especies (OTUs) presentes en la comunidad A.

b: Número de especies (OTUs) presentes en la comunidad B.

c: Número de especies (OTUs) presentes en las comunidades A y B.

- * Métricas UNIFRAC. Las métricas de diversidad UNIFRAC son índices que además de presencia-ausencia y abundancia, consideran la información referida a la relación filogenética que existe entre los miembros de una comunidad con respecto a otra. Mide la historia evolutiva única para una comunidad respecto de otra. Se basa en la medida de la fracción del largo de una rama del árbol filogenético que lleva a la descendencia de una muestra, pero no de ambas (Lozupone y col., 2011).

- Unweighted UNIFRAC

Mide la distancia entre dos comunidades, a través del cálculo de la fracción del largo de la rama que se despliega a una comunidad, pero no a la otra. Es una medida que tiene en cuenta presencia/ausencia, pero no la cantidad.

- Weighted UNIFRAC. Es una variante de Unweighted UNIFRAC, donde se tiene en cuenta además de la fracción del largo de la rama del árbol filogenético, la cantidad de comunidades que forman parte del grupo filogenético.

$$u = \sum_i^n b_i \times \left| \frac{A_i}{A_T} - \frac{B_i}{B_T} \right|$$

Donde:

n : Número total de ramas en el árbol.

B_i : Es el largo de la rama i .

A_i y B_i : Número de secuencias que descienden desde la rama i en las comunidades A y B respectivamente

A_T y B_T : Número total de secuencias en las comunidades A y B respectivamente.

Mediante las medidas de las matrices de distancias es posible determinar en que grado una comunidad es similar a otra ó dicho de otro modo, es posible establecer la existencia de algún grado de reemplazo entre las comunidades.

Los patrones obtenidos a partir de las matrices de distancia fueron visualizados mediante un Análisis de Coordenadas Principales, del inglés *Principal Coordinates Analysis* (PCoA). Para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las comunidades se realizó un análisis permutacional de la varianza (PERMANOVA), evaluando las diferencias entre los tratamientos, a partir de las matrices de distancia obtenidas en el análisis de las métricas de diversidad beta.

Análisis taxonómico

A partir de la tabla de OTUs obtenida, se agruparon aquellos pertenecientes a un mismo *phyllum* y/o clase. Esta información fue visualizada a través de gráficos de tortas.

Con el objetivo de determinar cuál es la comunidad *core* de los suelos, se computó el *core microbioma*, mediante el script *compute_core_microbiome.py* de QIIME, tomando como parámetros la presencia de un determinado OTU en la totalidad de las muestras analizadas y un porcentaje mínimo de 0.1 % de presencia.

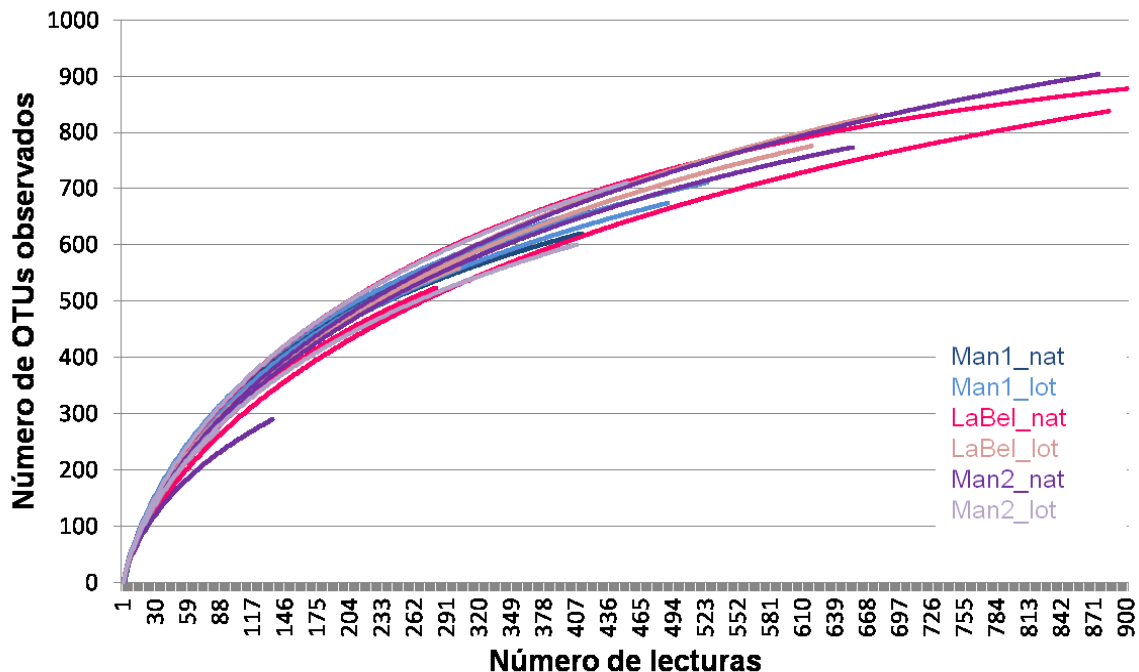
Los OTUs correspondientes a los *phyla* predominantes fueron graficados en forma de *heatmap*, para cada *phyllum* por separado, con el objeto de identificar los organismos más relevantes de cada grupo taxonómico, según las variaciones registradas entre las muestras, computadas a través de correlaciones de *Pearson*.

Resultados

Como resultado del análisis de comunidades bacterianas por *metabarcoding sequencing* y posterior demultiplexado, se obtuvieron 135918 secuencias. Estas secuencias fueron agrupadas en Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) al 97% de similitud. El número de OTUs inicialmente fue de 4656, pero descendió a 3187 luego de la eliminación de las secuencias que presentaban una única lectura (*singletons*), cloroplastos y secuencias que no correspondían a ninguna clasificación taxonómica.

Las curvas de rarefacción del número de secuencias versus el número de OTUs observados, no fueron asintóticas (Figura N° 1.4). Esto sugiere que, el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para cubrir la totalidad de la diversidad de este ambiente edáfico en particular. También se observó que una de las muestras registró un número de lecturas relativamente menor al resto de las demás muestras analizadas. Por tal motivo, los pasos correspondientes a la estandarización, para la comparación de la diversidad entre las comunidades, tuvieron como límite el menor número de lecturas.

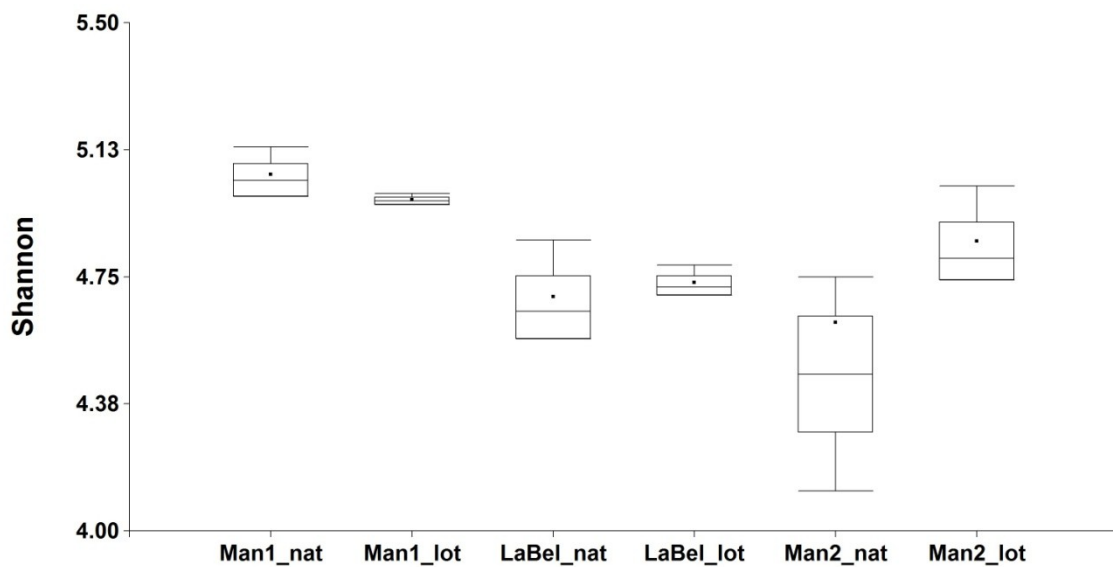
Figura N° 1.4. Curvas de rarefacción del número de OTUs observados sobre el número de secuencias o lecturas obtenidas por secuenciación de la región V4 del gen ribosomal 16S. Man1: Manantiales 1; LaBel: La Bellaca; Man2: Manantiales 2; nat: Pastizal natural, lot: promoción de *L. tenuis*.



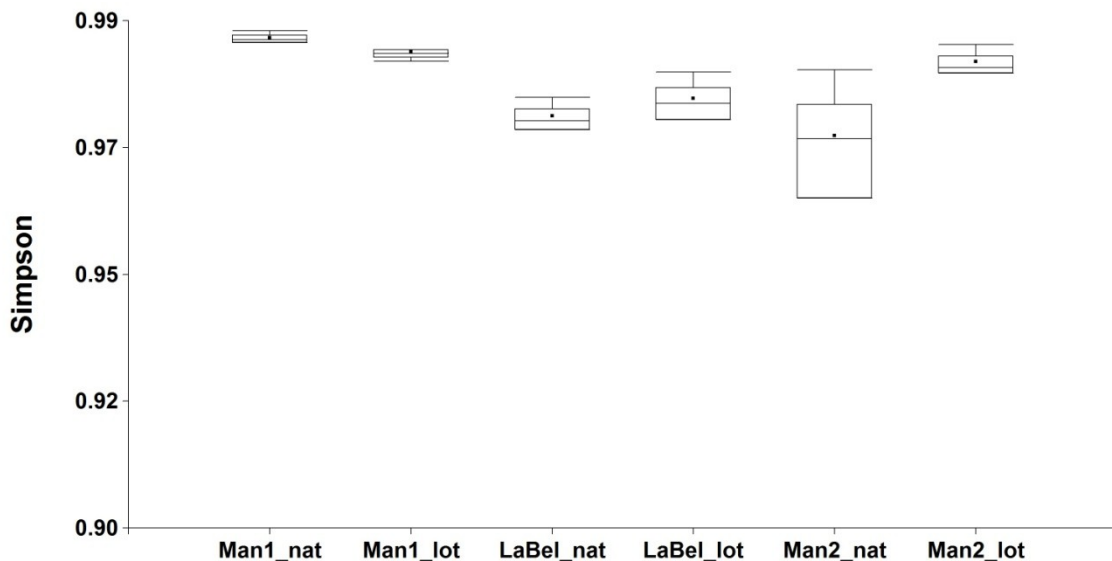
Análisis de Diversidad Alfa

Figura N° 1.5. Índices de diversidad alfa referidos a los OTUs obtenidos por secuenciación del gen ribosomal 16S, de las muestras de suelos de la Pampa Deprimida: Manantiales 1: “Man1”; La Bellaca: “LaBel” y Manantiales 2: “Man2”, bajo el efecto de Promoción de *L. tenuis*: “lot” ó Pastizal Natural: “nat”. a) Índice de diversidad de *Shannon*; b) Índice de Dominancia de *Simpson*; c) Estimador *Chao-1*. En el interior de cada caja se observa la mediana, en forma de línea horizontal; la media aritmética como punto; los bordes superior e inferior de las cajas constituyen los cuantiles 0.75 y 0.25, respectivamente; las patillas” constituyen los cuantiles 0.95 y 0.05.

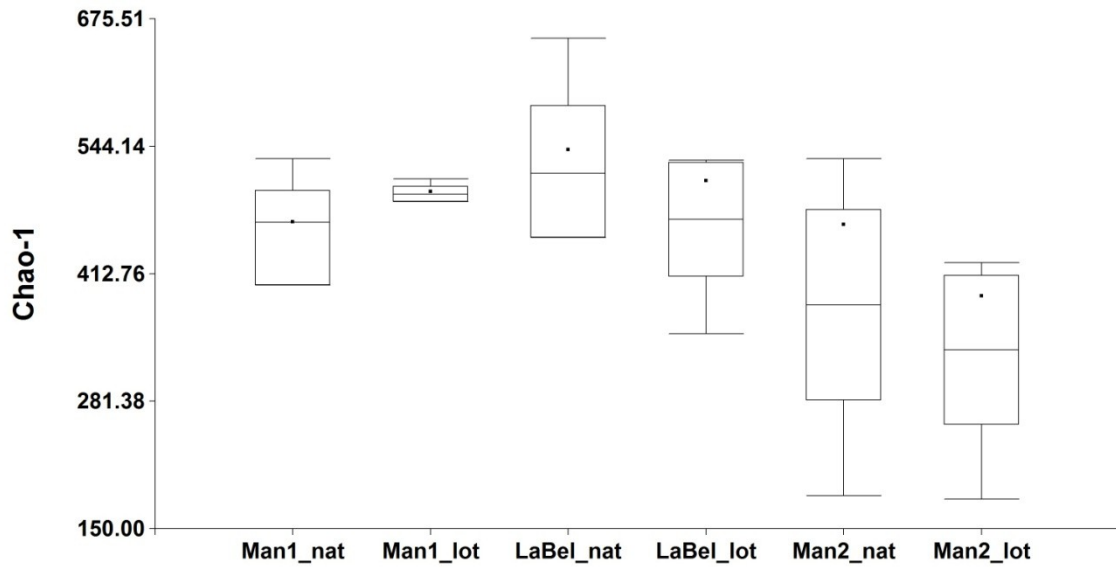
a)



b)



c)



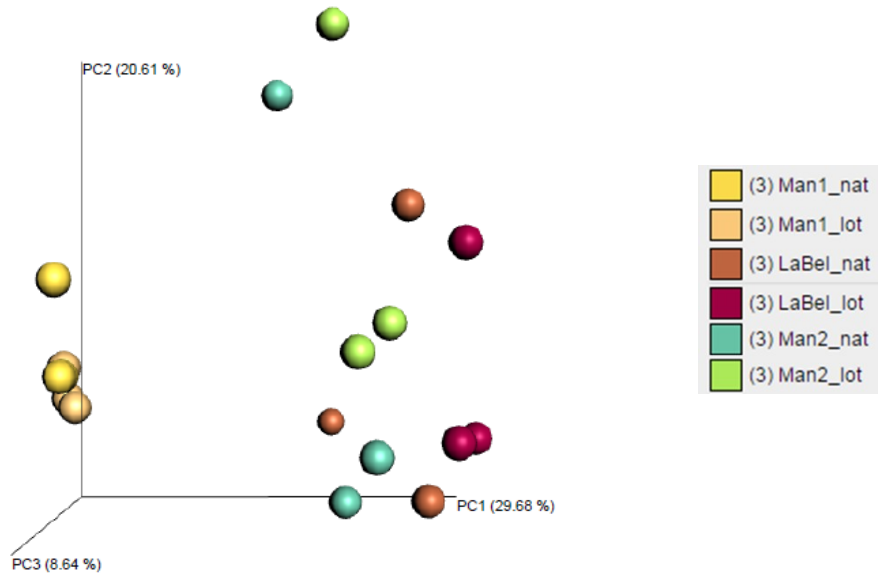
Los índices de diversidad alfa mostraron valores similares entre los tratamientos “Pastizal natural (nat)” y “Promoción de *L. tenuis* (lot)” en los tres sitios, para los tres índices evaluados. El análisis estadístico de las condiciones de uso del suelo, mediante el test de *Hotelling* mostró que no hubo diferencias significativas ($F=1.191$, $p=0.384$) en la combinación de los índices entre las dos situaciones de uso del suelo.

Análisis de Diversidad Beta

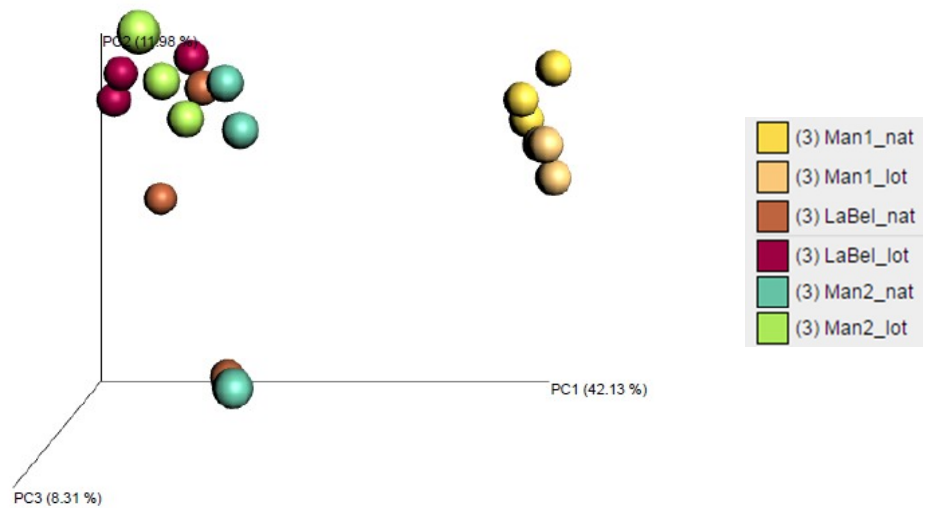
En la Figura N° 1.6, puede observarse que las muestras de los suelos se agrupan según el sitio y no en base al manejo al que están expuestos. También puede apreciarse que los suelos de los sitios “La Bellaca (LaBel)” y “Manantiales 2 (Man2)” presentan similitudes en la estructura de sus comunidades. En este sitio Manantiales 1 (Man1), la distancia entre las muestras correspondientes a “Promoción de *L. tenuis*” y “Pastizal natural” es mayor que en los otros dos sitios. Esto significa que el grado de reemplazo de las comunidades es mayor entre las comunidades de Manantiales 1 con respecto a los otros dos sitios.

Figura N° 1.6: Análisis de Coordenadas Principales en base a las matrices de distancias de a) *Bray –Curtis*; b) *Jaccard*; c) *Weighted UNIFRAC*; d) *Unweighted UNIFRAC*, basados en la información obtenida mediante el agrupamiento en OTUs de las secuencias 16S. Manantiales 1: “Man1”; La Bellaca: “LaBel” y Manantiales 2: “Man2”, bajo el efecto de Promoción de *L. tenuis*: “lot” ó Pastizal natural: “nat”.

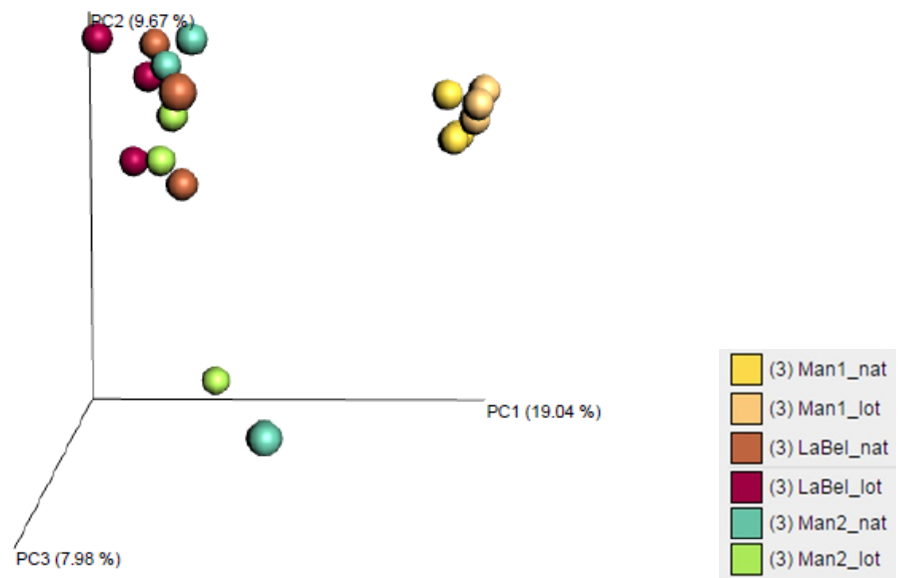
a)



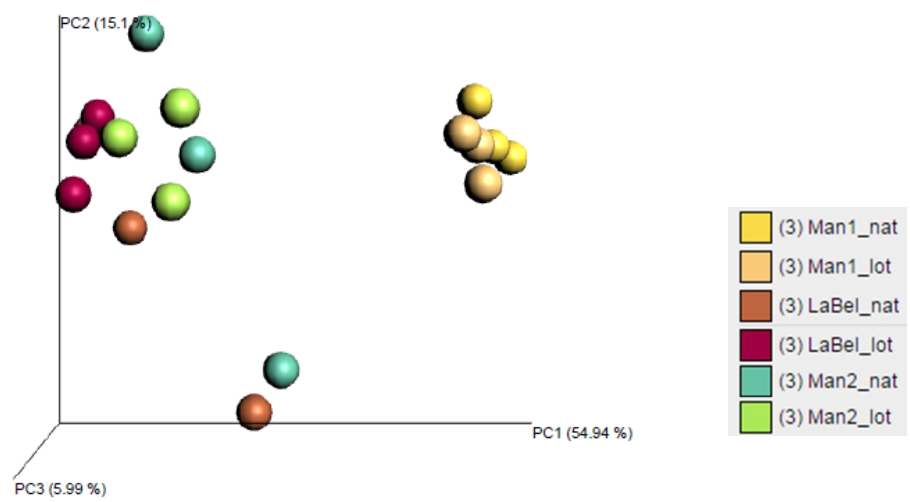
b)



c)



d)



Análisis estadístico multivariado

El análisis permutacional de la varianza (PERMANOVA) no registró diferencias significativas para los tratamientos “Promoción de *L. tenuis*” y “Pastizal natural”. Sin embargo, se detectaron diferencias a nivel del sitio. (Tabla N° 1.2). Este resultado se registró para todas las métricas de diversidad beta evaluadas.

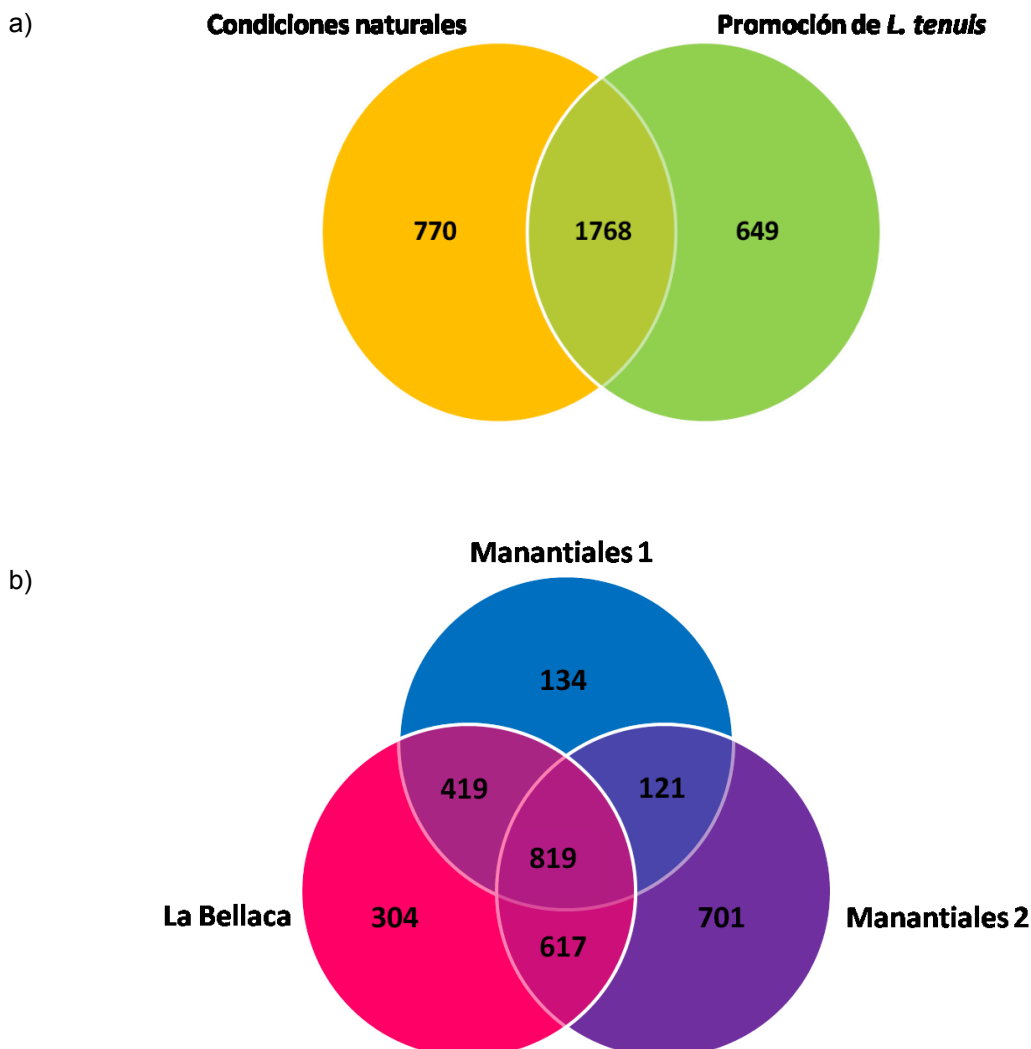
Tabla N° 1.2. Análisis PERMANOVA (999 permutaciones), considerando sitio y uso del suelo, basado en las matrices de distancias de *Bray-Curtis*, *Jaccard*, *Weighted UNIFRAC* y *Unweighted UNIFRAC*.

PERMANOVA (999 permutaciones)	Categoría	Métrica	Pseudo-F statistic	p-valor
	Sitio	<i>Bray-Curtis</i>	39.495	0.001
		<i>Jaccard</i>	6.705	0.001
		<i>Weighted UNIFRAC</i>	94.135	0.001
		<i>Unweighted UNIFRAC</i>	25.297	0.001
	Uso del suelo	<i>Bray-Curtis</i>	0.698	0.774
		<i>Jaccard</i>	0.880	0.464
		<i>Weighted UNIFRAC</i>	0.882	0.401
		<i>Unweighted UNIFRAC</i>	0.945	0.504

Composición taxonómica

A partir de un *Diagrama de Venn*, puede apreciarse la cantidad de OTUs correspondientes a cada situación. Desde el punto de vista del tratamiento de promoción de *L. tenuis*, existe aproximadamente la misma cantidad de OTUs que son exclusivos para cada una de las condiciones evaluadas (Figura N° 1.7.a). En el caso de los tres sitios, existe un mayor número de OTUs que son exclusivos al sitio “Manantiales 2”, seguidos por “La Bellaca” y un menor número en el caso de “Manantiales 1” (Figura N° 1.7.b). Manantiales 1 posee 134 OTUs exclusivos, mientras que en el sitio La Bellaca este número se duplica y en Manantiales 2 se quintuplica. Si bien este diagrama sólo refleja la presencia y ausencia de ciertos OTUs en cada tratamiento y no considera su abundancia, brinda una idea de la riqueza específica de la comunidad.

Figura N° 1.7. Diagrama de *Venn*, en base a los diferentes OTUs obtenidos mediante agrupamiento de las secuencias al 97% de similitud. a) Diagrama a nivel del tratamiento: Promoción de *L. tenuis* vs. Pastizal natural. b) Sitios de estudio.



Debido a que las diferencias obtenidas fueron determinadas por el sitio y no por el uso del suelo (Tabla N° 1.2), la composición taxonómica fue analizada a nivel de cada sitio (Figura N° 1.8)

Figura N° 1.8. Composición general de *phyla* presentes en el análisis de los suelos tomados como muestras representativas de la Pampa Deprimida, según las secuencias de la región V4 del gen 16S agrupadas en OTUs al 97% de similitud y la base de datos “Greengenes versión 2012.”

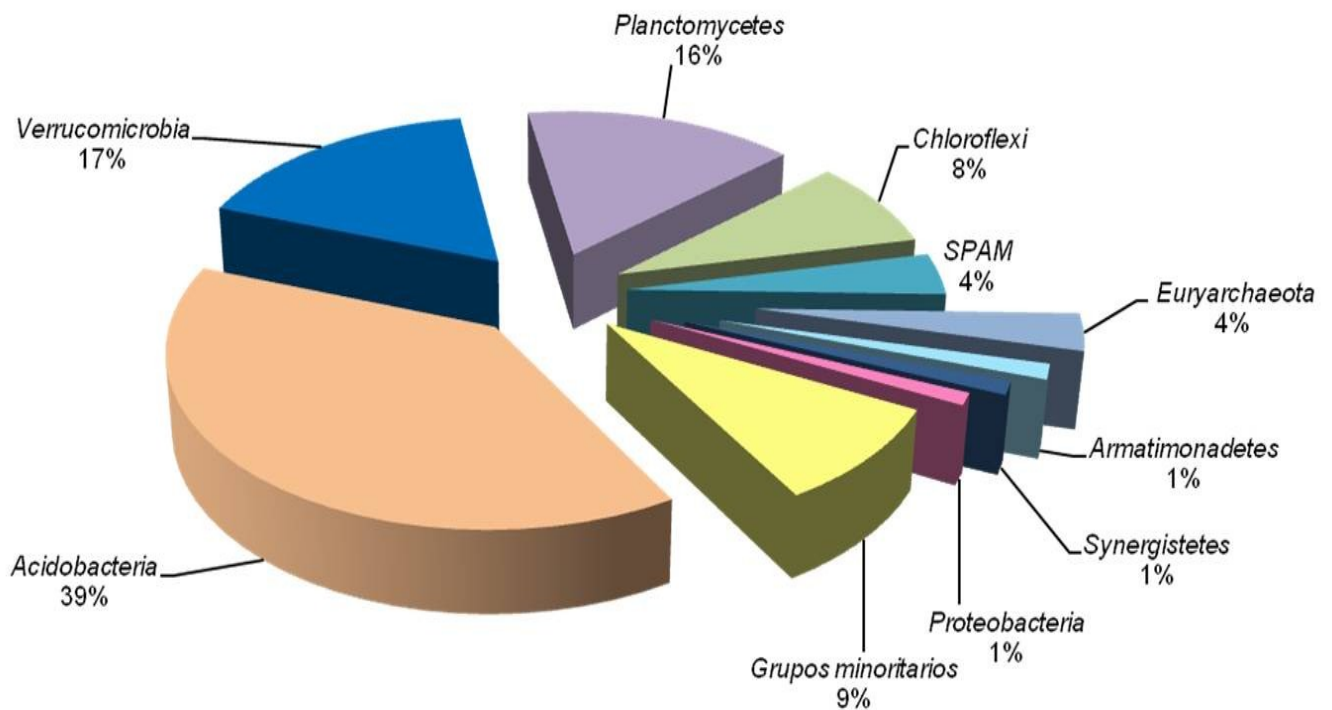
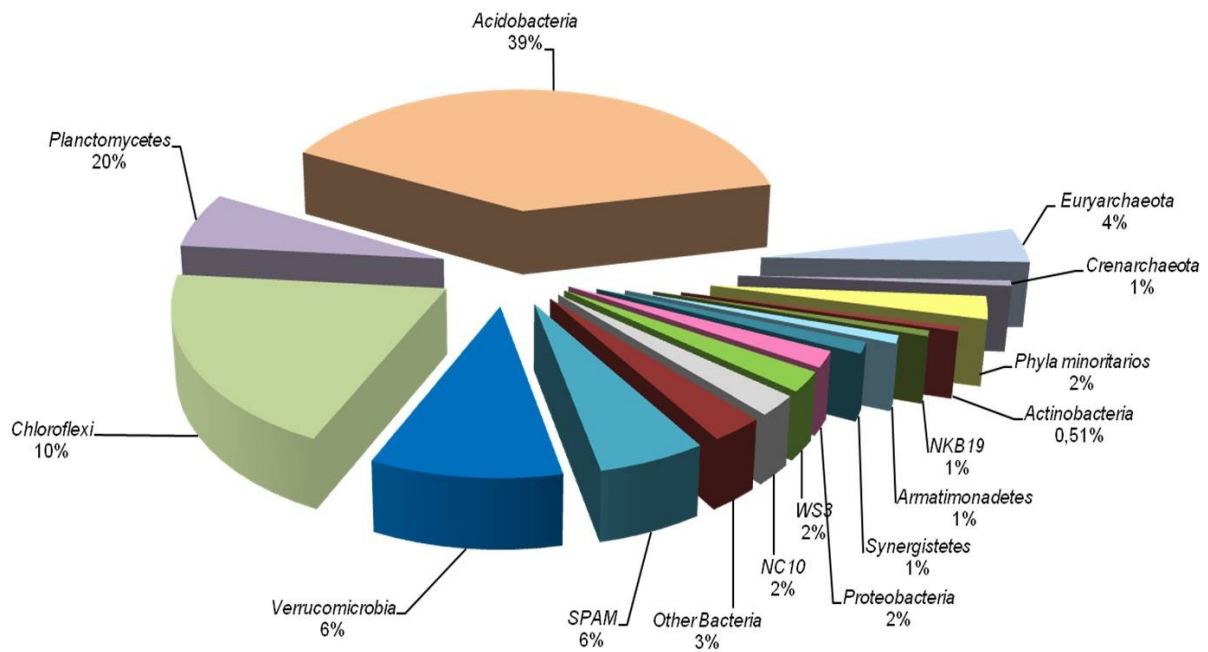
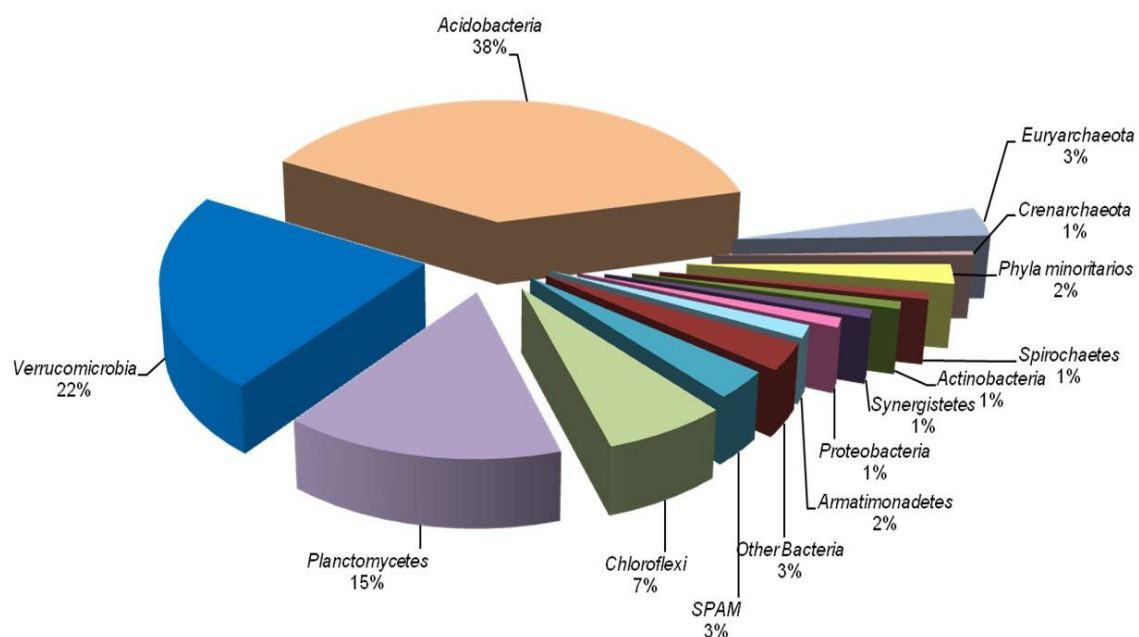


Figura N° 1.9. Composición taxonómica a nivel de *phyllum* de las secuencias de la región V4 del gen 16S agrupadas en OTUs al 97% de similitud. Identidad taxonómica según la base de datos “*Greengenes database versión 12*”. Los valores son referidos al número de lecturas totales por muestra por sitio. a) Manantiales 1; b) La Bellaca; c) Manantiales 2.

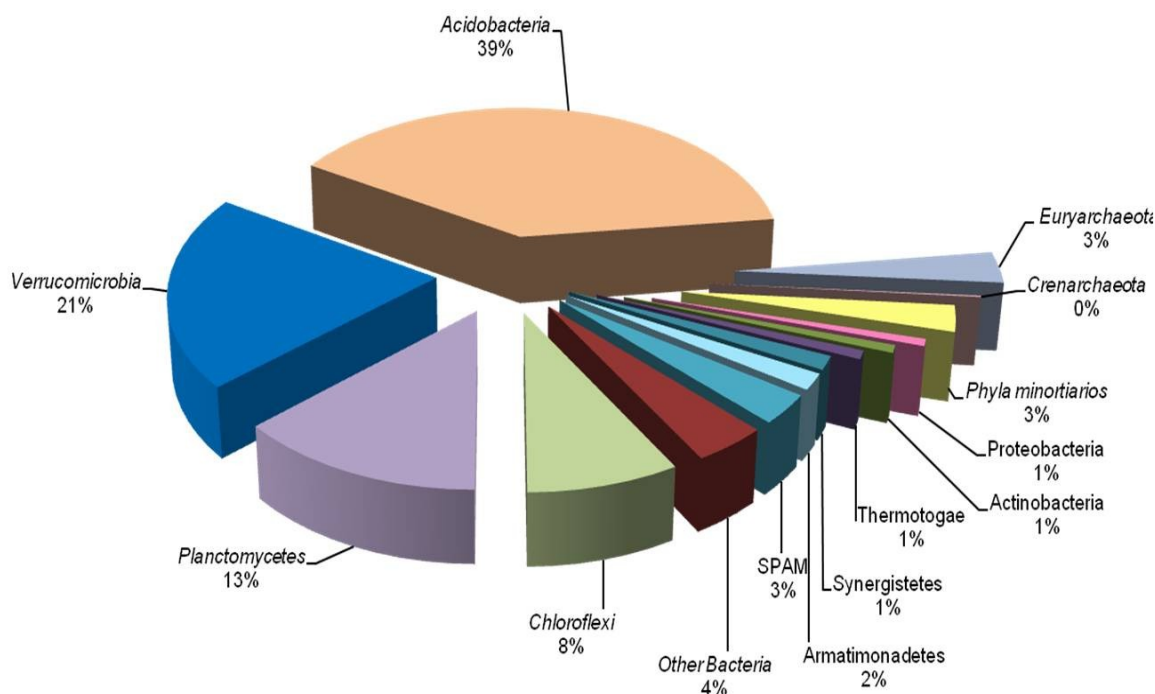
a)



b)



c)



El *phyllum* predominante en los tres sitios es *Acidobacteria*, seguido por *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* y *Planctomycetes*. En el sitio Manantiales 1, el segundo *phyllum* más abundante es *Planctomycetes*, seguido de *Chloroflexi* y *Verrucomicrobia*. En los otros dos sitios, el segundo *phyllum* más abundante fue *Verrucomicrobia*.

Por otra parte, se observó la presencia de organismos extremófilos del dominio *Archaea* en baja proporción. Se registraron dos *phyla* de este grupo: *Euryarchaeota* y *Chrenarchaeota*.

A pesar de que no hubo diferencias significativas a nivel de la estructura de las comunidades bacterianas, existieron algunas tendencias con respecto a la abundancia de ciertos OTUs en alguna de las condiciones de sitio-uso del suelo evaluadas. En la Figura N° 1.10 se expresa la abundancia de los OTUs correspondientes a las clases del *phyllum* *Acidobacteria* y su agrupamiento de acuerdo a las muestras evaluadas. Algunos OTUs particulares registraron mayor abundancia en los suelos del sitio La Bellaca, con respecto a los sitios Manantiales 1 y 2 y otros visceversa (Figura N° 1.10). En el caso de OTUs miembros de los otros *phyla*, la distribución fue homogénea (Figura N° 1.11, 1.12, 1.13)

Figura N° 1.10. Heatmap basado en la abundancia de OTUs pertenecientes al *phyllum* *Acidobacteria*, para cada una de las muestras evaluadas. Muestras y OTUs agrupados según el algoritmo *Pearson*.

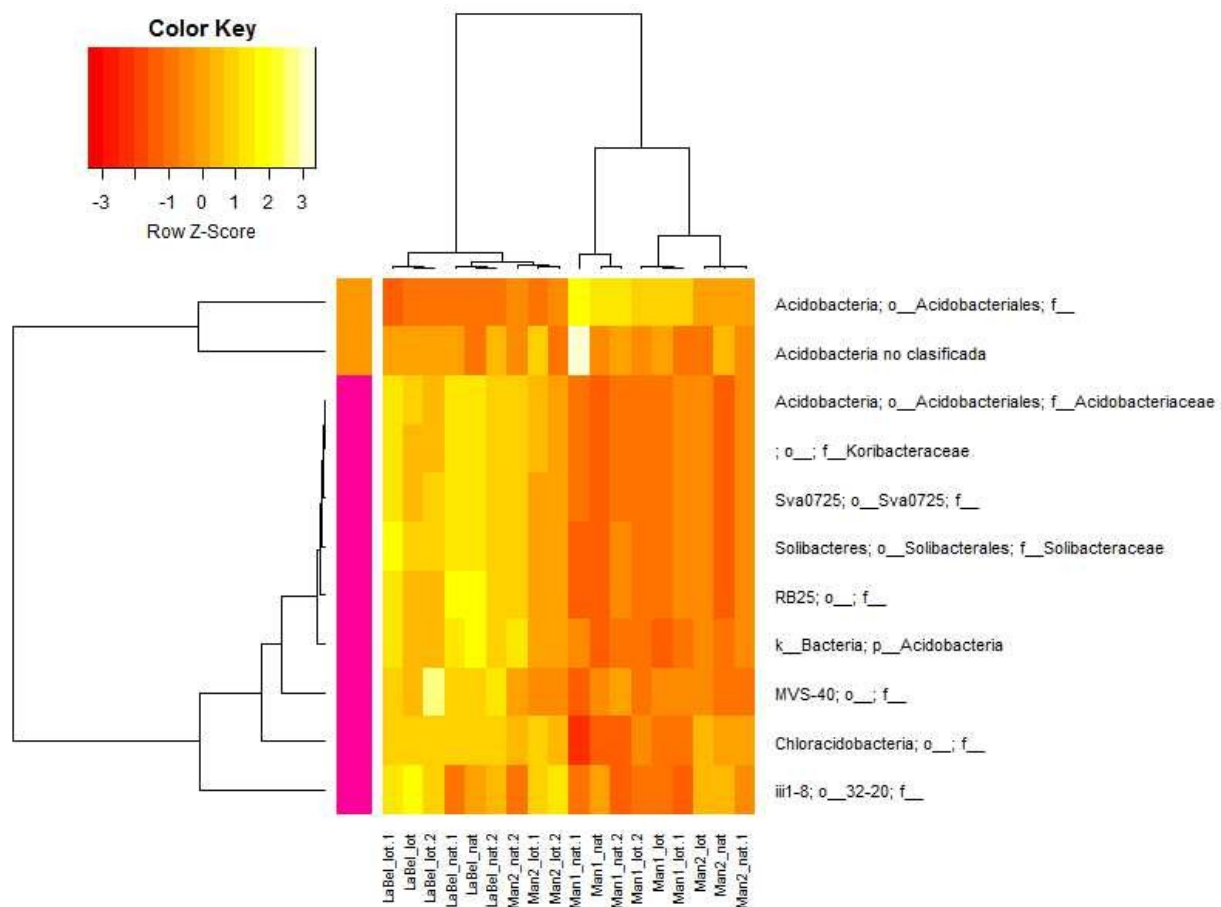


Figura N° 1.11. Heatmap basado en la abundancia de OTUs pertenecientes al *phyllum* *Verrucomicrobia*, para cada una de las muestras evaluadas. Muestras y OTUs agrupados según el algoritmo de *Pearson*.

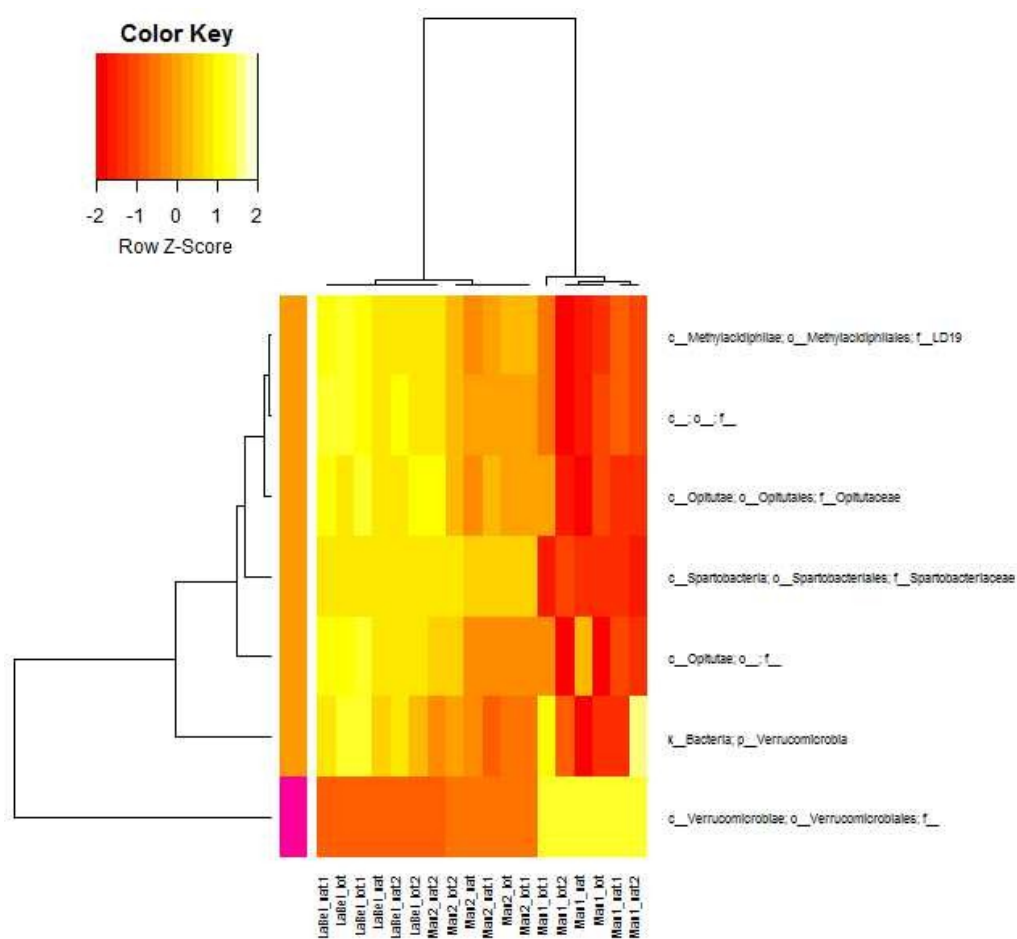


Figura N° 1.12. Heatmap basado en la abundancia de OTUs pertenecientes al *phyllum Chloroflexi*, para cada una de las muestras evaluadas. Muestras y OTUs agrupados según el algoritmo de *Pearson*.

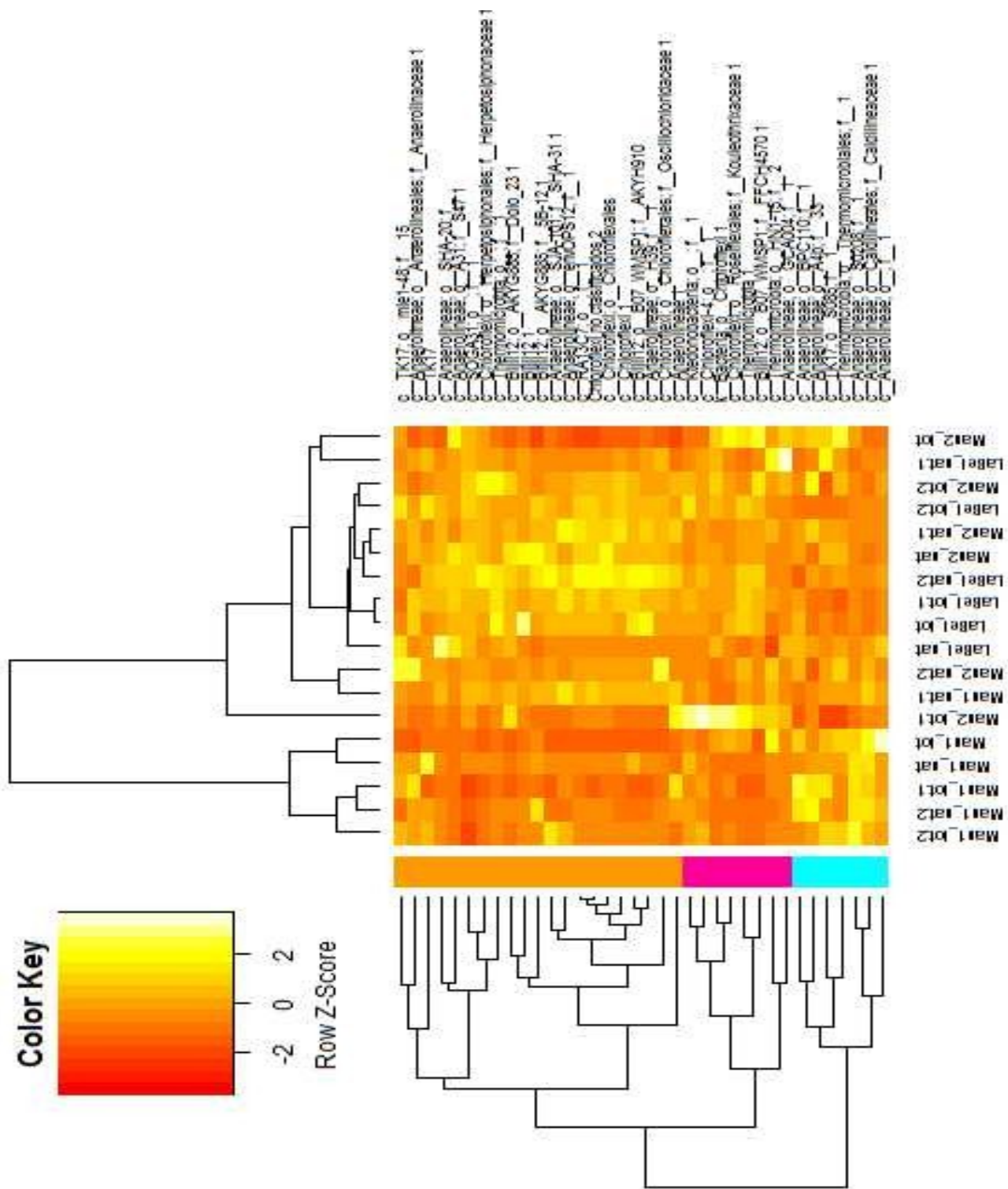
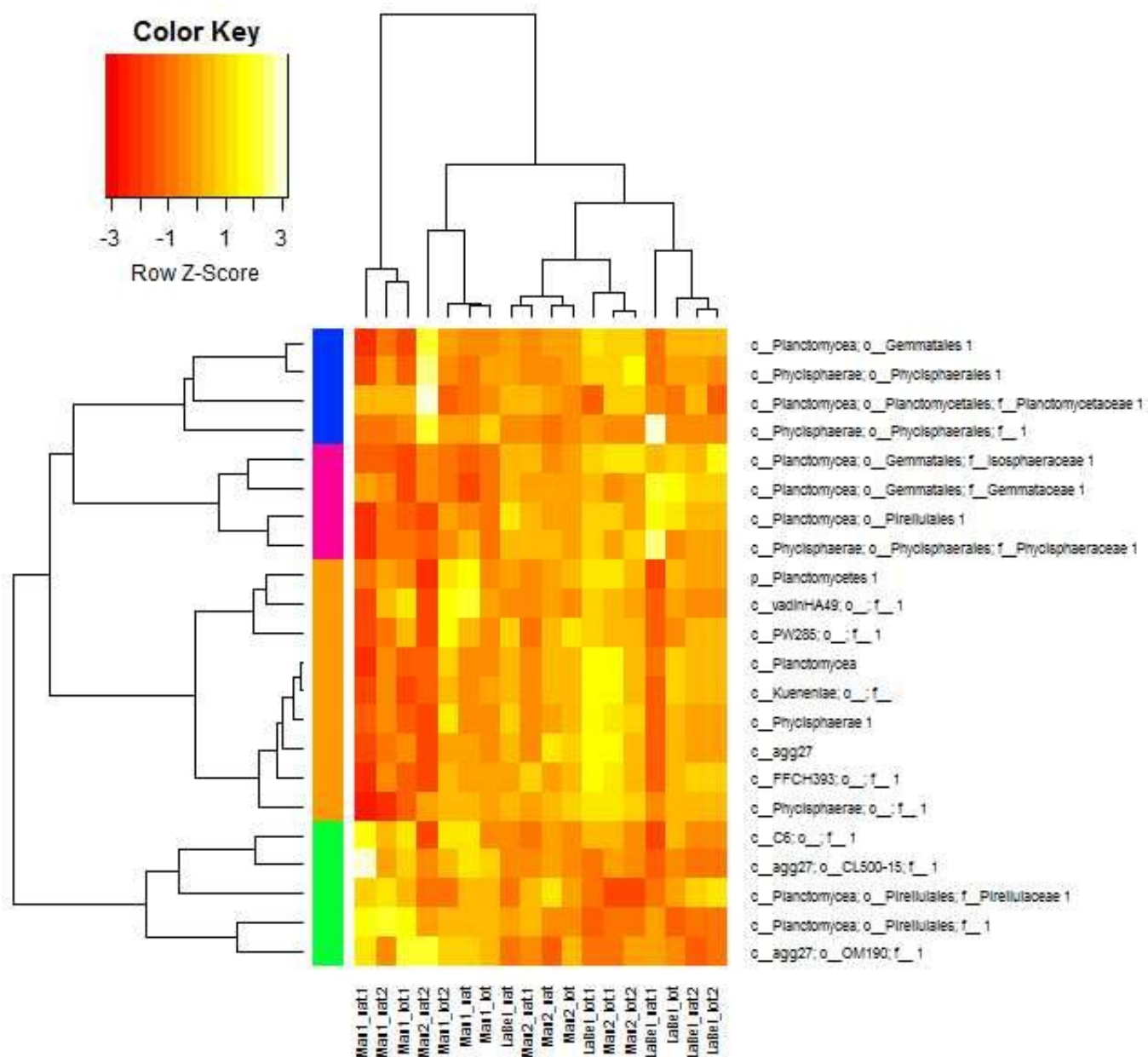


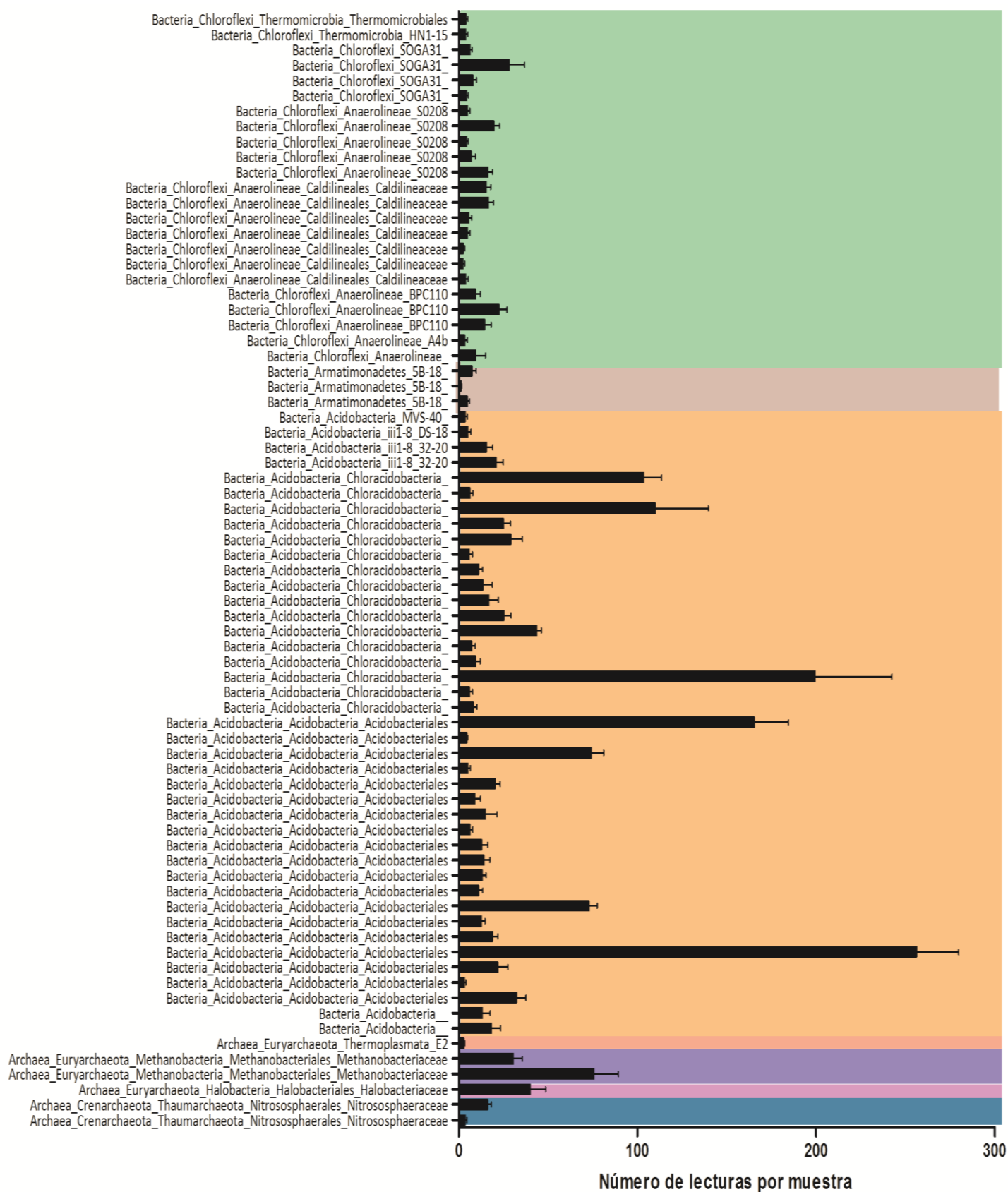
Figura N° 1.13. Heatmap basado en la abundancia de OTUs pertenecientes al *phyllum* *Planctomycetes*, para cada una de las muestras evaluadas. Muestras y OTUs agrupados según el algoritmo de *Pearson*.



Análisis del “core microbioma” para cada sitio

El análisis del core microbioma determinó un total de OTUs 134 representantes del suelo del sitio Manantiales 1, 97 OTUs para La Bellaca y 66 OTUs para Manantiales 2. (Figura N° 1.13).

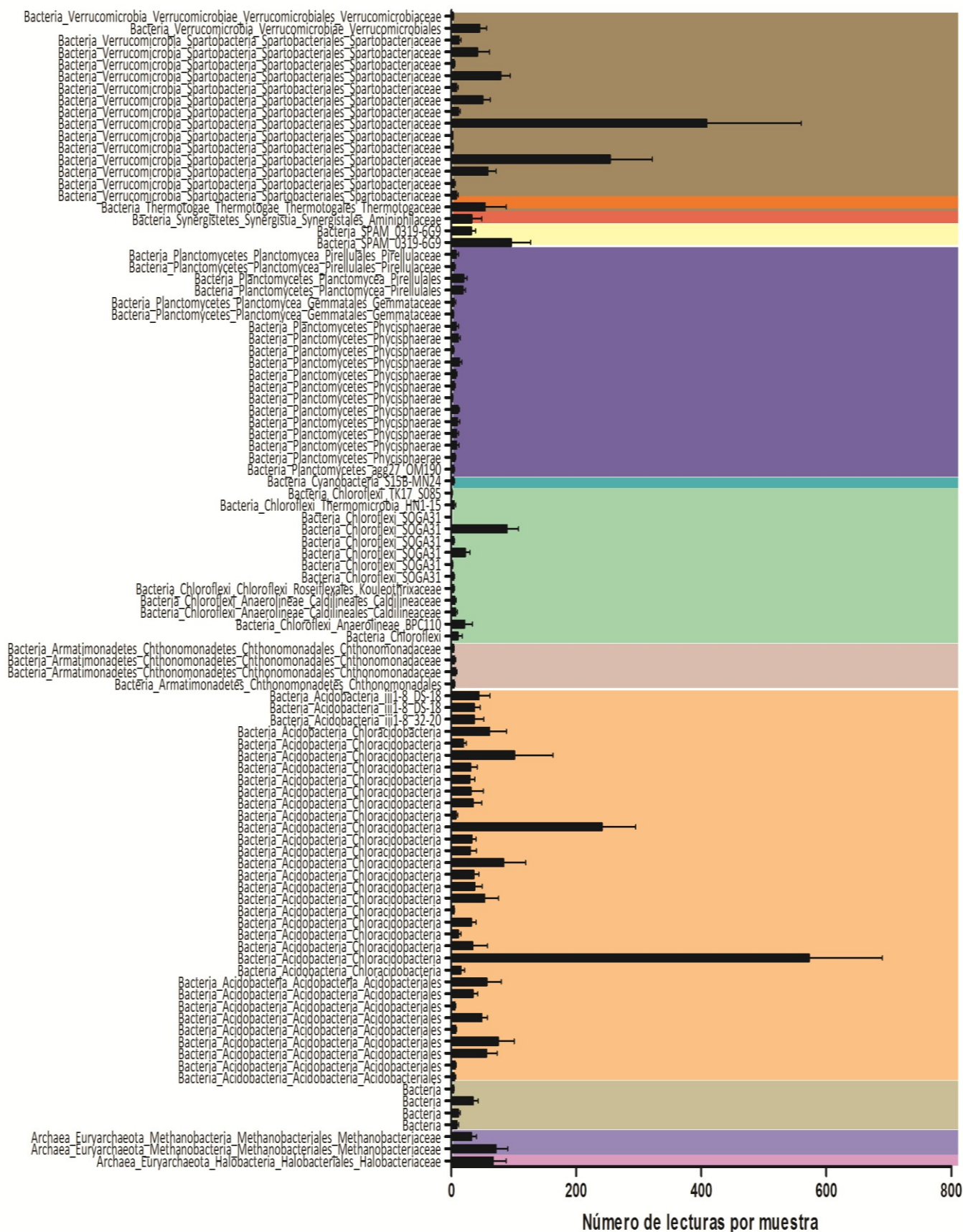
a)



a) (continuación)



b)



[illegible]

Discusión

Por lo general, las prácticas destinadas a mejorar la producción de pasturas, implican el uso de agroquímicos, ya sea por aplicación de fertilizantes ó por remoción de la vegetación acompañante mediante herbicidas. A su vez, la promoción de pasturas a través del uso de herbicidas convierte a la comunidad florística nativa y/o naturalizada en un sistema “de monocultivo” representado por la especie de interés, en este caso *L. tenuis*. En este caso, es esperable que el efecto de modificación de la descomposición del material vegetativo, los residuos químicos y la colonización por parte de la nueva especie, puedan afectar a la comunidad de organismos asociados al ambiente edáfico alterado.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, demostraron que el uso del suelo no afectó significativamente la estructura de la comunidad bacteriana, lo cual se opone a la hipótesis original planteada. Los valores de los índices de diversidad alfa fueron similares en todas las combinaciones sitio-uso del suelo. Esto indicaría que la práctica de promoción no tendría impacto, al menos en la comunidad de bacterias que habitan estos suelos. Resultados similares fueron observados en sistemas edáficos en donde se produjeron cambios en la composición florística (Zu y col., 2007). Por otro lado, los valores elevados del índice de *Simpson*, indicaron que en todas las muestras evaluadas, existió la dominancia de algunos OTUs con respecto al total de OTUs de la comunidad. Esta característica responde al hecho de que la metodología empleada para el estudio de la comunidad bacteriana tiende a sobreestimar la abundancia de pocos OTUs.

En base a los resultados expuestos en el análisis de diversidad beta, pudo evidenciarse que la presencia-ausencia de determinados OTUs, la abundancia y las variaciones filogenéticas de las comunidades bacterianas de los suelos, no se vieron influenciadas por el cambio en la composición florística que habita sobre los mismos. Como puede observarse, tanto en las construcciones de los PCoA, como en las pruebas estadísticas, las diferencias entre las comunidades están dadas a nivel de los sitios y no a nivel del uso del suelo. La comunidad de bacterias de los suelos no se ve afectada por el tratamiento de promoción de *L. tenuis*, pero sí por las condiciones diferenciales del suelo, siendo la heterogeneidad observada una característica edáfica distintiva de la región de la Pampa Deprimida. Por otro lado, se observó que uno de los sitios (Manantiales 1) presentó diferencias con el resto (Figura N° 1.6). Esto deja en evidencia las variaciones topográficas y la heterogeneidad edáfica que caracteriza la región y que conlleva a la

existencia de “parches de suelos” con características contrastantes, lo cual a su vez, estaría afectando directamente a la comunidad de bacterias asociadas.

Estudios previos, han calificado al glifosato como un herbicida “ambientalmente poco agresivo”, basándose dicha afirmación, en la ausencia de variaciones en la estructura de la comunidad asociada a la rizosfera de maíz resistente a glifosato (Barriuso y col. 2010). Por otra parte, también existen estudios donde se analizó directamente el efecto de los cambios en la composición de especies vegetales que influyen el suelo sobre la estructura de la comunidad bacteriana, observándose variaciones sólo a nivel de la rizosfera de las especies introducidas al sistema, pero sin variaciones significativas en el suelo circundante ó *bulk soil* (Marschner y col. 2001). Asimismo, otros estudios han sugerido la falta de correlación entre la composición de especies vegetales y la diversidad de bacterias en el suelo (Kowalchuk y col. 2002, Hooper y col. 1997).

Las razones por las cuales la modificación de la comunidad florística no afectó a la comunidad bacteriana, podrían estar relacionadas con la posible capacidad de ésta comunidad de resistencia y/o resiliencia frente a los cambios producidos en su ambiente por la aplicación del herbicida. También debe tenerse en cuenta lo reportado por otros autores que sugieren que la composición de especies en el suelo se ve afectada en gran medida por factores bióticos y abióticos y no por la composición florística (Zul y col. 2007). Teniendo en cuenta que el medio en donde habitan tanto la comunidad florística, como los microorganismos (y también la micro, meso y macrofauna), se trata de un ambiente edáfico, es importante considerar que la capacidad amortiguadora frente a los posibles cambios químicos en la composición del suelo, está dada por el suelo mismo y sus características físico-químicas distintivas. Otra razón de la no modificación significativa de la biodiversidad microbiana, podría ser que la promoción de *Lotus* constituye una práctica agronómica que no significó un cambio lo suficientemente abrupto como para producir una respuesta en la comunidad de bacterias del suelo. Por el contrario, otras actividades agronómicas de mayor impacto en la estructura edáfica, como por ejemplo la labranza convencional, han demostrado tener efecto sobre la estructura de las comunidades bacterianas, lo que se contrapone con lo observado con la labranza mínima y el uso de rotaciones (Rascovan y col. 2013).

Los dominios *Archaea* y *Bacteria* son ubicuos, con una gran versatilidad metabólica y fisiológica, lo que los tornan “esenciales” en todos los procesos biogeoquímicos conocidos. Los organismos del dominio *Archaea* son reconocidos por su capacidad de

crecer en ambientes extremos. *Euryarchaeota* es un grupo fisiológicamente diverso, que incluye organismos halófitos, termófilos y metanogénicos; mientras que *Crenarchaeota* son exclusivamente termófilos sulfuro-dependientes (Jurgens y Saano, 1999). Estudios filogenéticos demuestran que las arqueas adaptadas a ambientes salinos pertenecen a un grupo monofilético dentro del *phyllum* *Euryarchaeota*, familia *Halobacteriaceae* (Ochsenreiter y col., 2002). La presencia de una *Halobacteria* como miembro del la comunidad *core* se registró en los tres sitios evaluados, denotando la importancia de la salinidad en estos ambientes edáficos. También es importante destacar que, bacterias relacionadas a la producción de metano se registraron en dos de los sitios como miembros de la comunidad *core*, dejando en evidencia las posibles actividades bioquímicas relacionadas a la producción de gases, en las que participan ciertos miembros de la comunidad microbiana que habita en estos suelos.

Por su parte, el *phyllum* *Acidobacteria* fue es más abundante en el análisis. Este *phyllum* está distribuido en diversos ambientes con características físicas y biogeoquímicas variables; tales como suelos, sedimentos, agua y ambientes extremos. Pero particularmente, los miembros del *phyllum* *Acidobacteria* son característicos de los suelos y los sedimentos y comprende 26 subdivisiones filogenéticas (Barns y col. 2007; Branco y col. 2005; Janssen, 2006; Lee y col. 2008). Asimismo, también es conocido el hecho de que la diversidad de este *phyllum* es alta, afirmación basada en un análisis previo de secuencias rRNA 16S (Janssen, 2006). Desafortunadamente, la mayoría de los miembros del *phyllum* *Acidobacteria* son difíciles de cultivar *in-vitro* y sólo pudieron aislarse, 5 de las 26 subdivisiones existentes (Hugenholtz y col., 1998; Barns y col., 2007; Zimmermann y col., 2005).

Tal como su nombre lo indica, la característica del *phyllum* *Acidobacteria*, constituye la tolerancia o preferencia a condiciones ácidas. El nombre del *phyllum* deriva del primer aislamiento: *Acidobacterium capsulatum*, el cual fue aislado a partir de sedimentos ácidos en drenajes mineros. Sin embargo, es probable que esta característica no sea común a todos los miembros del *phyllum*. Estudios posteriores al descubrimiento del grupo, han demostrado que la subdivisión 4 de este *phyllum* es abundante en suelos neutros y alcalinos, hecho evidenciado en 12 suelos diferentes, mientras que su presencia fue variable en suelos con pH menores a 5,4; y no habiéndose detectado la presencia de bacterias pertenecientes a este *phyllum* en suelos con valores de pH menores de 4 (Barns y col. 1999). Asimismo, varios aislamientos del *phyllum* *Acidobacteria* fueron identificados

a partir de suelos alcalinos (Dunbar 1999, 2002). Por lo tanto, podría deducirse que este *phyllum* presenta abundancia en suelos con amplio rango de pH (Sait y col. 2006; Ward y col., 2009) y en consecuencia, su presencia no está solo limitada a las condiciones de acidez edáfica.

El *phyllum Verrucomicrobia* presentó una mayor abundancia relativa en los sitios La Bellaca y Manantiales 2, comparados con el sitio Manantiales 1. Este *phyllum* está fuertemente asociado a los suelos (Zhang y Xu, 2008) y es considerado uno de los *phyla* del dominio *Bacteria* menos abundante. Otra característica interesante de este *phyllum* es su dificultad para cultivarse en condiciones *in-vitro* (Bergmann y col. 2011; Joseph y col. 2003), lo cual constituye una desventaja, ya que es muy poca la información que puede obtener de este grupo con respecto a su actividad biológica. Sin embargo, se ha establecido que la mayoría de los miembros del *phyllum Verrucomicrobia* son mesófilos (Sangwan y col. 2004), anaerobios facultativos u obligados (Chin y col. 2001), sacarolíticos (Janssen, 1998) y oligotróficos (da Rocha y col. 2010, Senechkin y col. 2010). *Verrucomicrobia* ocupa diferentes nichos ecológicos tanto en horizontes superficiales como profundos, siendo su diversidad y abundancia regulada por factores ambientales. La importancia de *Verrucomicrobia* en este análisis, radica en que este *phyllum*, no solo está asociado a suelos, sino que su presencia se ha considera asociada específicamente a suelos de ambientes de praderas naturales y pasturas cultivadas (Fierer y col. 2013).

Estudios previos de meta-análisis de comunidades de *Verrucomicrobia*, han demostrado que la clase más abundante es *Spartobacteria* (Bergmann y col. 2011). En este análisis, también se observó esta clase como la más abundante en los sitios “La Bellaca” y “Manantiales 2”, mientras que en el sitio “Manantiales 1”, la abundancia de las clases del *phyllum Verrucomicrobia* estaba dividida entre *Spartobacteria* y *Verrucomicrobiae*.

Asimismo, se ha demostrado una correlación positiva entre la abundancia de organismos del *phyllum Verrucomicrobia* y los niveles de humedad del suelo (Buckley y col. 2001). Además, varias especies de este *phyllum* han sido aisladas de ambientes acuáticos y saturados (Janssen y col. 1997; Hedlund y col. 1997). Esta particularidad podría estar determinando la abundancia de este grupo en los suelos analizados, en donde el factor característico más importante es la baja infiltración y la consecuente anegabilidad.

Previo a su descubrimiento en suelos en el año 1992 (Liesack y Stackebrandt, 1992), el *phyllum Planctomycetes* estuvo siempre confinado a los ambientes acuáticos (Buckley y col. 2006) y hábitats hipersalinos (Fuerst y col. 1995). Actualmente se reconoce que existe una gran abundancia de este *phyllum* en diversos tipos de suelos (Buckley y Schmidt, 2003). Un aspecto interesante de este *phyllum*, es que presenta características distintivas frente a los otros *phyla*, como por ejemplo, no poseer pectidoglicanos en sus paredes celulares (Ward y col. 2006), dividirse por gemación y presentar diversos tipos de compartimentalización celular (Fuerst y col. 1995; Lindsay y col. 2001; Lunn y col. 2004). La mayoría de los aislamientos que pudieron ser cultivados fueron caracterizados como aerobios, quimio-organótrofos facultativos y especializados en el metabolismo de los carbohidratos. Sin embargo, también existe evidencia de que las capacidades metabólicas de este grupo son más diversas que las de otros *phyla* bacterianos (Buckley y col. 2006). La característica más distintiva y particular de este grupo es la capacidad de realizar la oxidación anaerobia del amonio, proceso conocido como ANAMOX, del inglés “*ANaerobic AMonium OXidation*”. Ciertos miembros, además contienen genes involucrados en la transferencia de una tetrahidrometanoproteína, sugiriendo el potencial metanotrófico de estas bacterias (Bauer y col. 2004; Chistoserdova y col., 2004; Kalyuzhnaya y col. 2005; 2005b). Otros estudios han demostrado una mayor abundancia de *Planctomycetes* en suelo anoxico (*bulk soil*) comparados con la rizosfera y sugieren que la oxigenación es importante para la determinación de la abundancia de este grupo (Derakshani y col. 2001).

Es importante destacar que la abundancia relativa de algunos de los *phyla* mayoritarios mostró variaciones entre los sitios evaluados. Sin embargo, una característica distintiva fue la abundancia del *phyllum Planctomycetes* en el sitio Manantiales 1. En base a la información de la bibliografía, podría sugerirse que las características de estos suelos serían más anaerobias y anegables que sus similares de La Bellaca y Manantiales 2. Sin embargo, entendemos que son necesarios nuevos estudios sobre las características químicas y capacidades metabólicas de los suelos, para conocer en profundidad las características funcionales del mismo y la afectación que ejercen sobre las mismas las variaciones ambientales.

Conclusión

El área de la Pampa Deprimida del Río Salado en la provincia de Buenos Aires presenta como actividad productiva predominante, la explotación ganadera. La actividad agrícola permanece limitada casi exclusivamente a los sitios en donde las condiciones edáficas son más propicias, caracterizadas por suelos de buen contenido de materia orgánica, carencia de concentraciones elevadas de sales y ausencia de procesos de anegamientos frecuentes. A ello debe sumarse el procesos de “extensión de la frontera agrícola” abarcando áreas destinadas tradicionalmente a la ganadería. Ante esta situación, el uso de *L. tenuis* como recurso forrajero, constituye una alternativa promisorio y rentable. Los niveles de producción y calidad de materia seca, en combinación con su capacidad de adaptación a estreses abióticos, convirtieron a esta leguminosa no nativa, en un recurso muy valioso para la alimentación del ganado.

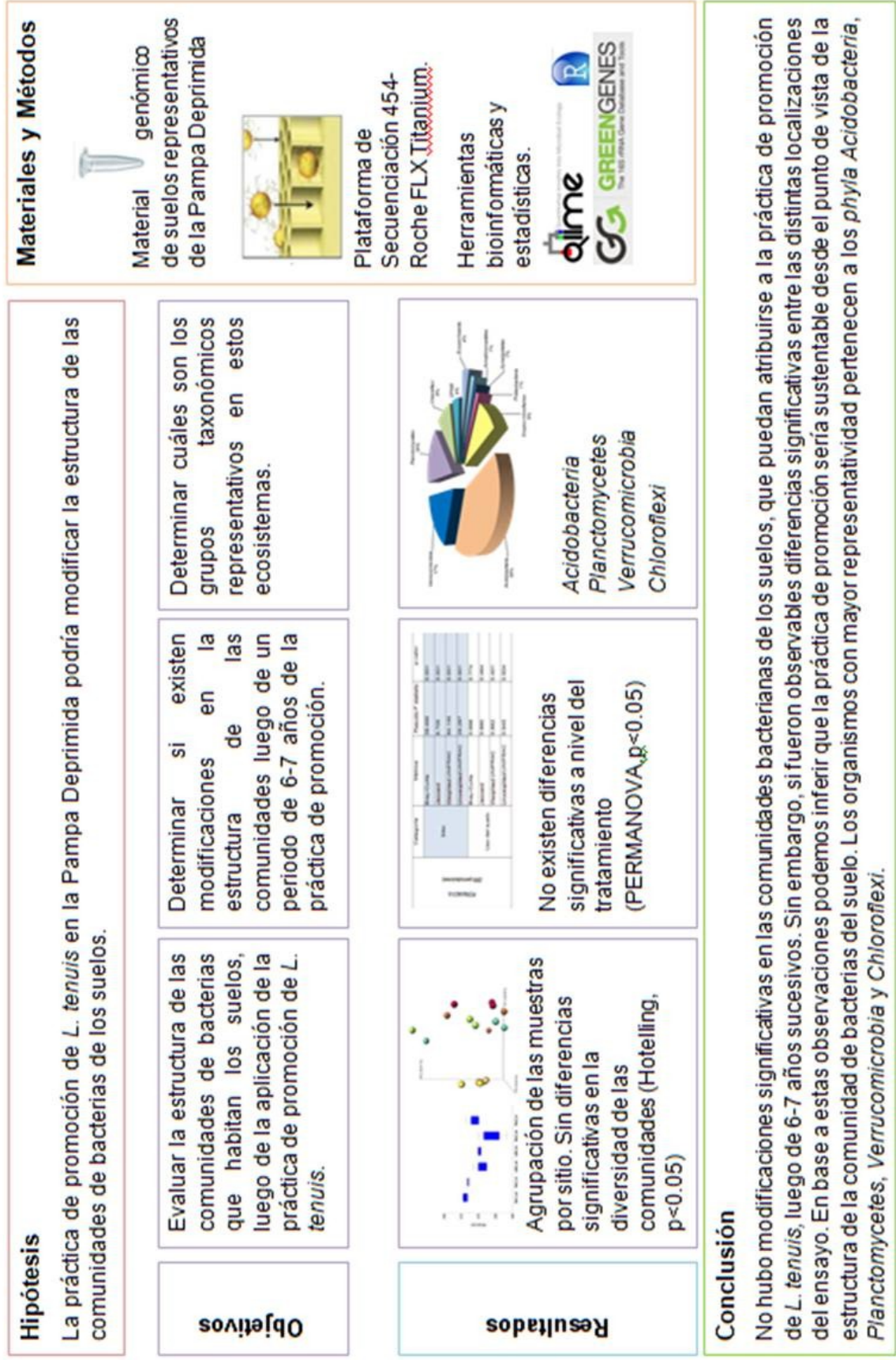
La producción de *L. tenuis* como alternativa forrajera para sostener la actividad ganadera se ha extendido con éxito en los últimos años. A pesar de ello y debido a procesos como el corrimiento de la frontera agrícola, se han diseñado diversas tecnologías que permitan incrementar su implantación y persistencia superando algunas falencias de la especie como por ejemplo su baja competitividad con la vegetación nativa de la región.

Si bien el reemplazo de la comunidad florística del pastizal natural por una leguminosa exótica, puede tener implicancias ambientales, también posibilita a que los suelos puedan mejorar sus propiedades físicas, modificando a mediano y largo plazo las propiedades químicas mediadas por las características de las raíces pivotantes, en comparación con la situación inicial donde el pastizal natural está compuesto predominantemente por gramíneas.

En esta primera aproximación acerca del efecto del cambio de la composición florística como consecuencia de la práctica de promoción de *L. tenuis* a través de años sucesivos, se demuestra que no hubo modificaciones significativas en la estructura de la comunidad de bacterias de los suelos. Esto podría dar un indicio de la sustentabilidad de la práctica y su posible utilización en los agroecosistemas como “practica productiva amigable con el medio ambiente”. Sin embargo, es necesaria la evaluación de la funcionalidad de la comunidad de bacterias a través de técnicas que permitan una mayor comprensión de las reacciones bioquímicas asociadas a las mismas y las modificaciones que pudieran producirse por eventos que modifiquen el ecosistema.

Los grupos taxonómicos identificados en este estudio, demuestran la importancia de la utilización de técnicas independientes de cultivo, para la obtención de información completa acerca del grupo de organismos estudiado. Una proporción importante de bacterias de éste análisis, fueron identificadas en grupos de organismos no cultivables en condiciones *in-vitro*. Estas aproximaciones permiten además establecer de manera más completa la caracterización de la comunidad bacteriana a nivel taxonómico.

Diagrama Resumen – Capítulo 1



Capítulo 2

Caracterización de la comunidad fúngica de los suelos de la Pampa Deprimida, bajo el efecto de la práctica de Promoción de *Lotus tenuis*. Influencia de los factores abióticos en la distribución de la comunidad

Introducción

Los hongos cumplen un rol importante en el ecosistema, como descomponedores, patógenos y simbiontes (Newsham y col., 1995; Kibblewhite y col., 2008). Por esta razón, nos pareció importante conocer cuáles son los miembros que forman parte de la comunidad de hongos de los suelos en evaluación y detectar las especies que se modifican luego de la implementación de la práctica de promoción de *L. tenuis*.

Como se explicó en el Capítulo 1, *L. tenuis* es una especie leguminosa de alto valor forrajero, naturalizada en la Pampa Deprimida. La práctica de promoción de *L. tenuis* ha sido desarrollada para cubrir la demanda forrajera en el verano (Nieva y col., 2016), fundamentada en que a pesar de la alta capacidad de resiembra natural por parte de *L. tenuis* (Entio, 2011), la especie es una mala competidora en los primeros estadios del establecimiento de las plántulas con respecto a la vegetación nativa (Llobet y col., 2012). Al igual que lo planteado anteriormente, la modificación de la comunidad vegetal mediada por la aplicación de herbicidas pre-emergentes para facilitar la dominancia de *L. tenuis*, podría tener efecto sobre la composición de la comunidad de microorganismos fúngicos que habitan el suelo, modificando el ecosistema sobre el cual se asienta la multiplicación de la leguminosa.

Hasta el momento del presente trabajo de Tesis, no existían estudios acerca del efecto de la modificación en la composición florística mediada por herbicidas en la Pampa Deprimida, sobre la estructura y la diversidad de los hongos de los suelos. Los antecedentes sobre la temática estuvieron centrados en la evaluación de grupos particulares como por ejemplo las especies del género *Glomus* (Druille y col., 2013, 2015; Sannazzaro, 2004; Mendoza y col., 2005; Escudero y Mendoza, 1005).

Se estima que más de un millón de especies de hongos no han sido aún descriptas (Hawksworth, 1991). Además, existe idéntica problemática que se aplica a los estudios sobre la diversidad de bacterias: se estima que sólo el 17% de los hongos que se conocen en la actualidad, pueden ser cultivados de forma *in-vitro* (Hawksworth, 1991). Teniendo en cuenta que un gran porcentaje de hongos cumplen al menos una parte de su ciclo de vida en el suelo, ó asociados de forma directa al mismo (Bridge y Spooner, 2001), es de gran importancia profundizar el estudio de los integrantes de este Reino. En la actualidad, mediante el uso de técnicas de secuenciación masiva, como por ejemplo la tecnología 454-Roche, es posible identificar los miembros de la comunidad de hongos de

una muestra ambiental, sin la necesidad del cultivo de los mismos *in-vitro*, en medios nutritivos. El marcador universal utilizado para la identificación de hongos es el espaciador interno transcrito, del inglés Internal Transcribed Spacer (ITS) del ADN ribosómico 18S (Gardes y Bruns, 1993; White y col., 1990). Este marcador génico es utilizado para el estudio de comunidades de hongos que involucran la secuenciación de alto rendimiento (Schoch y col., 2012). La tecnología de secuenciación conocida como NGS se ha convertido en una herramienta potente para examinar la diversidad entre comunidades fúngicas de diferentes suelos (Wang y col., 2015; Zhou y col., 2016).

Del mismo modo en que el *core microbioma* está definido como los miembros compartidos a lo largo de un consorcio de hábitats similares (Shade y Handelsman, 2012) y son representados por los organismos bacterianos presentes en al menos el 90% de las muestras individuales (Pose-Juan y col., 2017; Kellogg y col., 2017), también es posible definir el *core mycobioma* establecido sobre la base del consorcio de especies de hongos, las cuales no están sujetas a cambios significativos, constituyendo la comunidad que presenta resistencia y/o resiliencia frente a los disturbios y variaciones en el ambiente del suelo (Orgiazzi y col., 2008).

Importancia ecológica de los hongos del suelo

La importancia ecológica de los hongos del suelo no solo radica en la función descomponedora de los mismos (lo que consecuentemente, facilita la disposición de los nutrientes para las especies vegetales), sino también en su capacidad de facilitar la degradación de compuestos recalcitrantes, como la lignina y los compuestos húmicos, lo cual se constituye como una propiedad casi exclusiva de los organismos del Reino *Fungi*. Asimismo, los hongos asociados al suelo también interactúan con los organismos vegetales de manera simbiótica. El ejemplo de la simbiosis ampliamente distribuida en la naturaleza entre plantas y hongos, es la que constituye la asociación con hongos micorrícicos. Existen diferentes tipos de hongos micorrícicos además de los HMA, algunos capaces de cumplir la misma función que los HMA, sin la necesidad de la condición biotrófica del organismo fúngico. Establecen además, un lazo de comunicación entre el suelo y las raíces y tienen aportes en la estructuración del suelo, con las consecuencias derivadas para otros microorganismos y demás seres vivos que habitan el ambiente edáfico. El suelo en sí mismo, constituye un reservorio de propágulos fúngicos, que se encuentran en forma latente para formar un nuevo ciclo, adaptándose de acuerdo a las condiciones ambientales y las implicancias en el ecosistema que las mismas generen

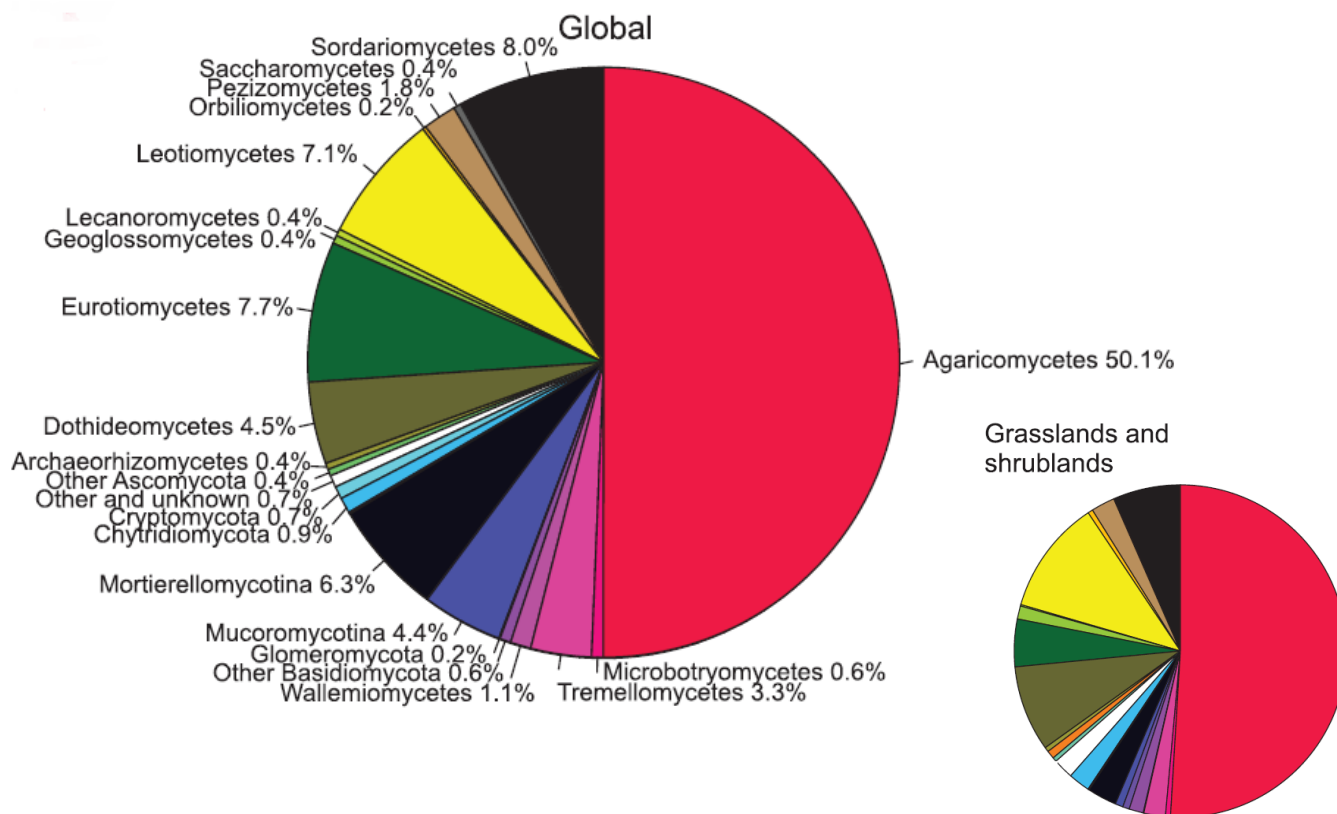
(Bridge y Spooner, 2001). Resulta evidente que las actividades biológicas en las que están involucrados los hongos del suelos, además de tener importancia en los organismos vegetales, también tienen incidencia en las comunidades de insectos, bacterias, nematodos, y la microfauna asociada (Bridge y Spooner, 2001).

Además de las relaciones benéficas, existen interacciones de tipo patogénicas que involucran a los organismos fúngicos. Las interacciones patogénicas se dan entre plantas y hongos, pero también sobre insectos y con otros organismos fúngicos, siendo un ejemplo de ello el fenómeno de control biológico, el cual está ampliamente difundido en el Reino *Fungi* y que además, es utilizado como herramienta para el control de plagas y enfermedades en cultivos agrícolas, siendo uno de los objetivos biotecnológicos más relevantes y estudiados de la actualidad.

La distribución de hongos en el suelo

Si bien los hongos son organismos ubicuos en el suelo, existen diferencias en cuanto a la composición de las comunidades fúngicas en diferentes ambientes edáficos, dadas tanto por factores ambientales como por el tipo de vegetación. A nivel global se ha estudiado la variación de diferentes organismos fúngicos de acuerdo a diferentes ecosistemas, incluyendo a los naturales y a aquellos con modificaciones por la actividad agrícola. Los grupos taxonómicos principales están distribuidos uniformemente a lo largo de los ecosistemas, variando levemente de acuerdo a las condiciones climáticas, edáficas y la composición florística (Figura N° 2.1)

Figura N° 2.1. Distribución de los taxones que componen la comunidad de hongos de los suelos, a nivel global y para ecosistemas de pasturas. (Extraído de Tedersoo y col., 2014).



Factores que determinan la composición de la comunidad fúngica en los suelos

Al igual que todos los seres vivos, la ocurrencia de diferentes especies de hongos se modifica bajo diferentes factores ambientales (Lauber y col., 2008; Rousk y col., 2010). Teniendo en cuenta las condiciones edáficas tomadas como objeto de estudio, no existen estudios que correlacionen de manera completa las variables físico-químicas del suelo con la presencia de ciertas categorías taxonómicas de microorganismos, en los suelos de la Pampa Deprimida. En la literatura, es posible encontrar estudios globales que relacionan la ocurrencia de ciertas comunidades fúngicas asociadas a con factores tales como la latitud, el pH y algunos iones a nivel global (Tedersoo y col., 2014). Por otra parte, debido a que la mayoría de los hongos prefieren el pH ácido para su crecimiento, son particularmente interesantes los estudios en los cuales se manifiesta el crecimiento de estos microorganismos organismos en condiciones edáficas con pH elevado (Zhang y col., 2016).

Asimismo, existe una relación muy dinámica entre las comunidades fúngicas y los factores que constituyen las características del suelo, y en general constituye un criterio aceptado, que la modificación de una variable edáfica de manera significativa, puede tener efecto sobre otra variable del ecosistema, al influir de manera directa y/o indirecta sobre factores tales como la disponibilidad de nutrientes, oxígeno, agua, etc., lo que a su vez conlleva a la modificación de las comunidades de microorganismos asociados. La no modificación significativa en las comunidades bacterianas del ecosistema por el tratamiento de promoción del *L. tenuis* (Capítulo 1), motivó nuestro interés por el desarrollo de un estudio similar con las comunidades fúngicas y la posibilidad de establecer, en caso que la misma se modificase, las posibles correlaciones entre los parámetros edáficos y las comunidades de hongos presentes.

Antecedentes en estudios de organismos fúngicos en suelos de la Pampa Deprimida

Estudios previos sobre microorganismos del suelo, llevados a cabo en la región, han dejado en evidencia que *L. tenuis* es colonizado por HMA, aún en condiciones de salinidad y alcalinidad (Sannazzaro y col., 2006). Asimismo, también se ha investigado acerca del efecto directo e indirecto del glifosato, aplicado en el suelo y en la zona foliar de *L. tenuis* y *Paspalum dilatatum* respectivamente. Dicho estudio, registró una disminución en la viabilidad de esporas de HMA y en la germinación de las mismas, bajo el efecto del herbicida, en ambas especies vegetales (Druille y col., 2013 a), como así también la disminución de la colonización en las raíces (Druille y col., 2013 b).

Si bien, los HMA son uno de los ejemplos de organismos de gran importancia agronómica y ecológica, hasta el momento de dar inicio a este trabajo de tesis, no se habían realizado estudios que caractericen la diversidad de la comunidad de hongos de los suelos de la región en forma completa, considerando a todos los miembros del Reino *Fungi*. Es por ello que consideramos necesario el reconocimiento de la diversidad de hongos del suelo y su relación con la incorporación de *L. tenuis* al ecosistema, lo que permitiría además, inferir el estado de la sucesión ecológica de la comunidad y su incidencia sobre el establecimiento de los grupos funcionales de microorganismos.

Hipótesis

La práctica de promoción de *L. tenuis* (mediada por herbicidas) tiene efectos sobre la estructura de las comunidades de hongos de los suelos en la Pampa Deprimida, manifestado en cambios en los índices de diversidad alfa y beta.

Objetivos

1. Examinar el efecto del uso continuo de la práctica de promoción de *L. tenuis* sobre la composición y diversidad de la comunidad de hongos de suelos, en la Pampa Deprimida.
2. Determinar si existen modificaciones en la estructura de las comunidades luego de un periodo de 7-8 años de ejecución de esta práctica.
3. Determinar cuáles son los grupos taxonómicos representantes en estos ecosistemas.
4. Establecer correlaciones entre los parámetros físico-químicos del suelo y la distribución de la comunidad fúngica.

Materiales y Métodos

Los procedimientos relacionados con los sitios de estudio, recolección de muestras y extracción del material genómico fueron idénticos a los realizados en el Capítulo 1 para el estudio de comunidades bacterianas, empleándose los mismos lotes, para la recolección de las muestras.

Sitios de estudio

Ídem al Capítulo 1.

Recolección de muestras, acondicionamiento y extracción del material genómico

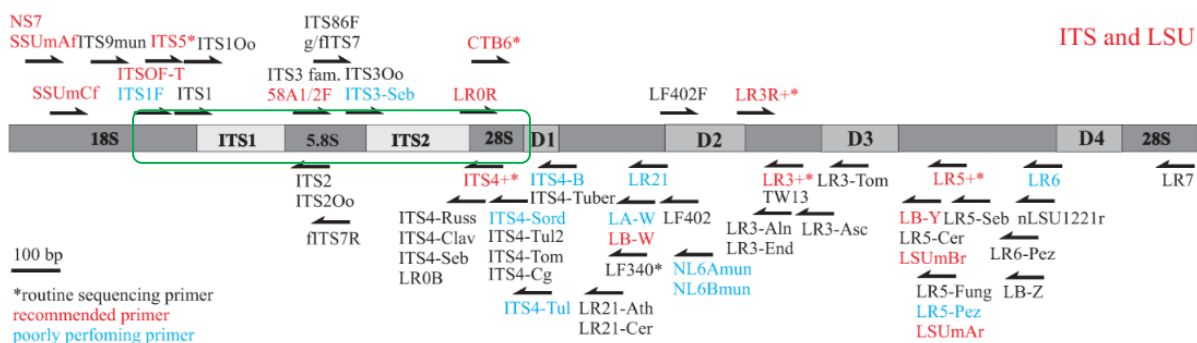
Las muestras fueron tomadas en el mes de Noviembre del 2015 (dos años posteriores al momento de la recolección de las muestras para el estudio de comunidades bacterianas), en los mismos lotes en los que se realizó el estudio de comunidades bacterianas del Capítulo 1, siguiendo el mismo diseño experimental y con idéntico procesamiento de las sub-muestras de suelo, para cada sitio y tratamiento. Cada *pool* de muestras, fue homogeneizado manualmente y tamizado a través de un tamiz de 2 mm de diámetro de poro. Una fracción correspondiente a cada muestra fue utilizada para la extracción de ADN y el resto fue enviado al Instituto de Suelos del INTA Castelar, para los análisis de las propiedades físico-químicas correspondientes.

La extracción del material genómico se realizó a partir de una alícuota de 0.5 gr de suelo homogeneizado y la utilización del kit comercial "*Power Soil ADN isolation kit (MOBIO)*". La concentración e integridad del material genómico fue evaluada a través de espectrofotometría (*Synergy TM H1, BIOTEK*) y electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Preparación de las librerías de amplicones

Se amplificó la región *target* ITS del gen ribosómico 18S (Figura N° 2.2). Esta región es ampliamente utilizada como marcador molecular para el estudio e identificación de hongos y además, ha sido propuesta para el estudio de comunidades mediante el uso de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Los cebadores universales utilizados en este caso fueron: ITS1F: 5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3' (Gardes y Bruns, 1993) y ITS4: 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' (White y col 1990).

Figura N° 2.2. Región ITS del gen ribosomal 18S. (Adaptado de *Unified System for the DNA based fungal species linked to the classification* (UNITE) Version 7.1)



Posteriormente se realizó una re-amplificación para incluir los adaptadores *ROCHE-454* “A” y “B”, de acuerdo a las especificaciones de la tecnología de secuenciación utilizada. En este paso, también se incluyeron las secuencias de nucleótidos identificadores, para posibilitar la clasificación de las muestras durante el análisis bioinformático de las secuencias

Demultiplexado de las secuencias y filtrado por calidad

Ídem al Capítulo 1.

Agrupación de las secuencias en OTUs

Ídem al Capítulo 1.

Elección de la secuencia representante

Ídem al Capítulo 1.

Alineamiento de las secuencias y asignación taxonómica

Las secuencias representantes fueron alineadas mediante el algoritmo PyNAST (Caposaro y col., 2010). La identidad taxonómica de cada OTU fue asignada mediante el algoritmo clasificador *rdp* y la base de datos *UNITE database update* versión 2012 (Abarenkov y col., 2010). Se utilizó un nivel de confianza de 0.5, es decir que para que pueda asignarse una identidad taxonómica a una secuencia representante, esta debía presentar una similitud de al menos un 50% con respecto a la secuencia de la base de datos, de identidad taxonómica conocida.

Generación de la tabla de OTUs

Ídem al Capítulo 1.

Estandarización y transformación

Ídem al Capítulo 1.

Generación de las curvas de rarefacción

Ídem al Capítulo 1.

Análisis de Diversidad

El estudio de diversidad tiene por objetivo caracterizar a la comunidad en cuanto a sus propiedades intrínsecas (Diversidad Alfa) y comparar la estructura de las mismas (Diversidad Beta).

Diversidad alfa

Idem al Capítulo 1.

Diversidad Beta

Idem al Capítulo 1 y con la incorporación del índice probabilístico *Raup-Crick* (Chase y col., 2009), obtenido mediante la función *vegdist* del paquete estadístico *Vegan* para el entorno R (Oksanen y col., 2012).

La visualización de los patrones encontrados a través de las matrices de distancias de diversidad beta fueron realizadas a través de un ordenamiento mediante un PCoA, al igual que los realizados en el Capítulo 1, como así también el análisis estadístico multivariado para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas, mediante un análisis permutacional de la varianza (PERMANOVA).

Análisis taxonómico

A partir de la tabla de OTUs obtenida, se agruparon aquellos pertenecientes a un mismo phylum y/o clase.

Con el objetivo de determinar cuál es la comunidad *core* de los suelos, se computó el *core mycobioma*, mediante el script *compute_core_microbiome.py* de QIIME, tomando como parámetros la presencia de un determinado OTU en la totalidad de las muestras analizadas y un porcentaje mínimo de 0.1 % de presencia.

Análisis de las variables físico-químicas del suelo

Luego de la extracción del material genómico, las muestras de suelo remanentes, fueron enviadas al Laboratorio de Análisis de Suelos perteneciente al Instituto de Suelos del INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina. Cada muestra fue analizada de acuerdo con las normas IRAM-SAGyP (SAMLA, 2004).

Las variables analizadas fueron las siguientes:

- Carbono Orgánico (CO) y Materia Orgánica total (MO), mediante el método de Walkley y Black (Walkley y Black, 1934).
- Nitrógeno (N), mediante el método de Kjeldahl (Bremner, 1965).
- pH de la pasta de saturación, mediante pHmetro.
- Salinidad a través de la conductividad eléctrica del extracto de saturación (CE).
- Fósforo disponible o extractable (AP) a través del método Bray I (Bray y Kurtz, 1945).
- Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC), mediante el método de desplazamiento por Acetato de Amonio (Chapman, 1965).
- Aniones y cationes, mediante espectrofotometría.
 - Sodio (Na).
 - Potasio (K).
 - Magnesio (Mg).

- Calcio (Ca).
- Sodio Intercambiable (ex_Na).
- Magnesio Intercambiable (ex_Mg).
- Calcio Intercambiable (ex_Ca).
- Potasio Intercambiable (ex_K).
- Sulfatos (Sul).
- Cloruros (Clo).
- Bicarbonatos (Bic).
- Los índices relacionados a la sodicidad fueron calculados a partir de los resultados obtenidos previamente:
 - Relación de Adsorción de Sodio (RAS).

$$RAS = \frac{Na}{((Ca+Mg))/2^2}$$
 - Porcentaje de Sodio Intercambiable (PSI).

$$PSI = \frac{\text{Sodio Intercambiable (EX Na)}}{\text{Capacidad de Intercambio Cationico (CIC)}}$$
- El índice Carbono Nitrógeno (C/N), fue obtenido posteriormente con los datos de CO y N.

La variabilidad y la influencia de los parámetros físico- químicos en las combinaciones sitio-uso del suelo, fueron ordenadas mediante un análisis de componentes principales, del inglés *Principal Component Analysis* (PCA), a fines de identificar las posibles diferencias causadas por la heterogeneidad del ambiente edáfico entre los tratamientos y sitios.

Correlación con variables físico-químicas del suelo

Una vez determinadas las características físico-químicas de los suelos, de donde se obtuvo el material génico para el secuenciamiento masivo, se procedió a evaluar la influencia de las variables ambientales sobre la diversidad fúngica.

En primera instancia se realizó un test de “*Mantel*” para comprobar la existencia de una correlación estadísticamente significativa entre la estructura de la comunidad y las variables que tendrían influencia sobre la misma. Para la realización de este test se utilizó el comando *mantel_test.py* de QIIME. El test Mantel se basa en la correlación de dos

matrices simétricas. Como representante de la estructura de la comunidad fúngica, se utilizó la matriz de distancias de *Bray-Curtis* y una matriz de distancias euclideas, construida a partir de los datos obtenidos en los análisis de las propiedades físico-químicas de los suelos.

En segunda instancia, se realizó un Análisis de Correspondencias Canónicas, del inglés *Canonical Correspondence Analysis* (CCA) para determinar la relación entre las Clases taxonómicas más abundantes y las variables ambientales del suelo. Las Clases se seleccionaron en base a los OTUs que representaron al menos el 0.1% del total de las secuencias analizadas. La elección de las variables significativas para el modelo, se realizó a través de la selección de variables no redundantes, por medio del Factor de inflación de la varianza, del inglés *Variance Inflation Factor* (VIF), calculado a través de la función *vif*, perteneciente al paquete estadístico *Vegan* para el entorno R (Oksanen y col., 2012). La significancia estadística del modelo y el aporte de las variables al mismo, se realizó a través del Test permutacional de Monte Carlo.

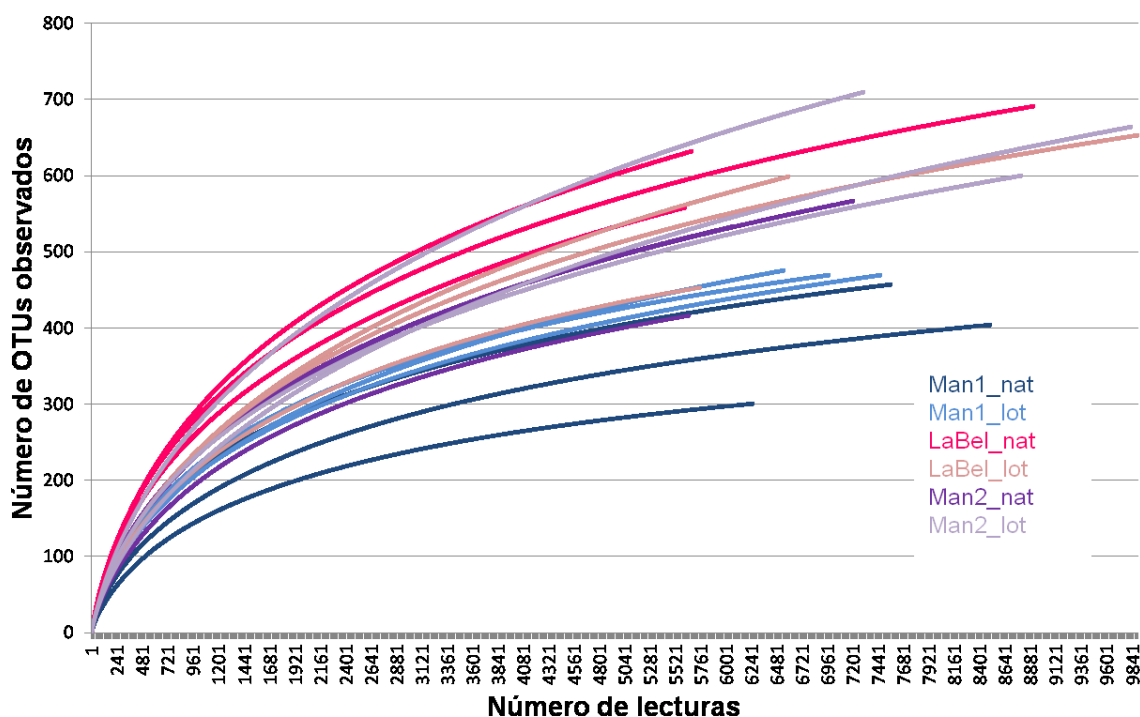
Adicionalmente se establecieron correlaciones entre la información taxonómica a nivel de phylum y las variables físico-químicas del suelo a través de correlaciones de *Spearman* ($p < 0.05$).

Resultados

Como resultado del análisis por *amplicon sequencing* y posterior demultiplexado, se obtuvieron 130794 secuencias. Estas secuencias fueron agrupadas en OTUs al 97% de similitud. Luego de la eliminación de las secuencias que presentaba una única lectura (*singletons*), y secuencias que no correspondían a ninguna clasificación taxonómica, el número de lecturas se redujo a 129870, representando un total de 2433 OTUs.

Las curvas de rarefacción del número de secuencias versus el número de OTUs observados, no fueron asintóticas (Figura N° 2.3). Esto sugiere que el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para cubrir la totalidad de la diversidad de este ambiente edáfico en particular.

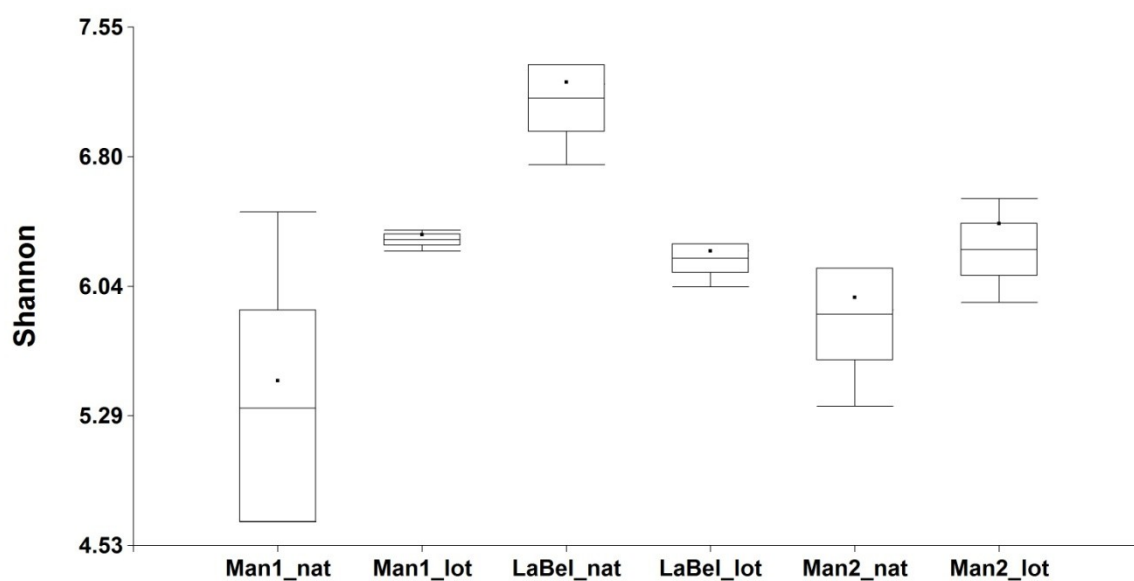
Figura N° 2.3. Curvas de rarefacción del número de OTUs observados sobre el número de secuencias ó lecturas obtenidas por secuenciación de la región ITS1-ITS2 del gen ribosomal 18S.



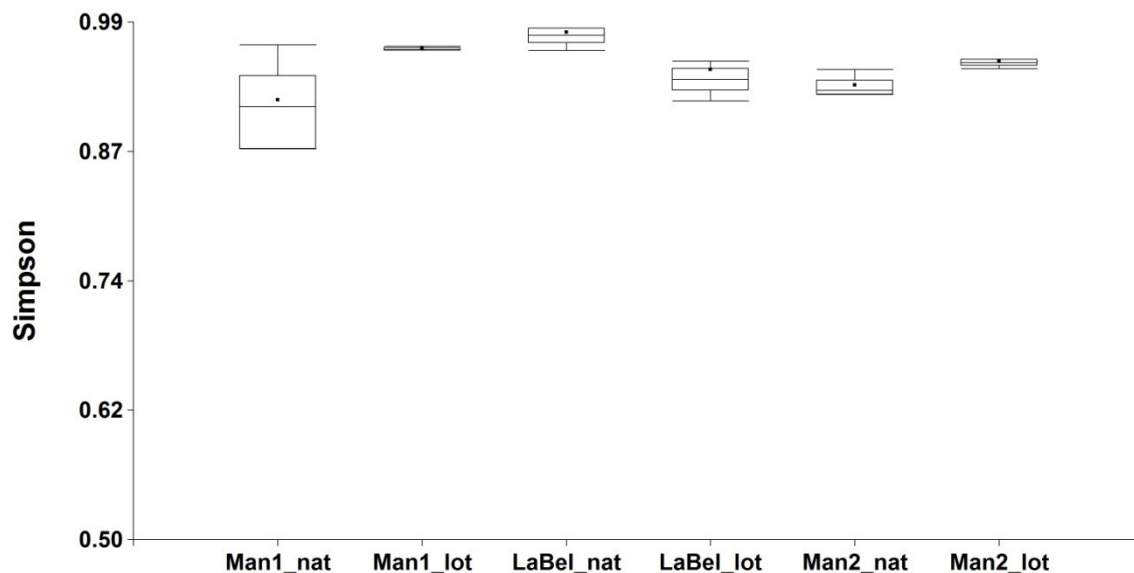
Análisis de Diversidad alfa

Figura N° 2.4. Índices de diversidad alfa referida a los OTUs obtenidos por secuenciación del gen ribosomal 18S de las muestras de suelos de la Pampa Deprimida: Manantiales 1: “Man1”; La Bellaca: “LaBel” y Manantiales 2: “Man2”, bajo el efecto de Promoción de L. tenuis: “lot” ó Pastizal natural: “nat”. a) Índice de diversidad de *Shannon*; b) Índice de dominancia de *Simpson*; c) Estimador *Chao-1*. En el interior de cada caja se observa la mediana, en forma de línea horizontal; la media aritmética como punto; los bordes superior e inferior de las cajas constituyen los cuantiles 0.75 y 0.25, respectivamente; las patillas” constituyen los cuantiles 0.95 y 0.05.

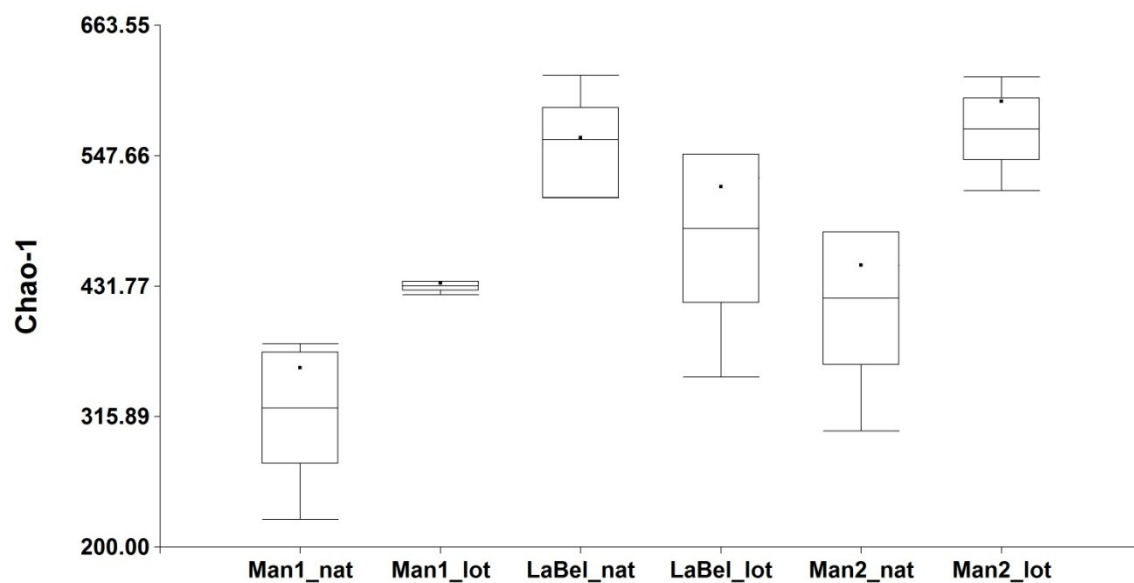
a)



b)



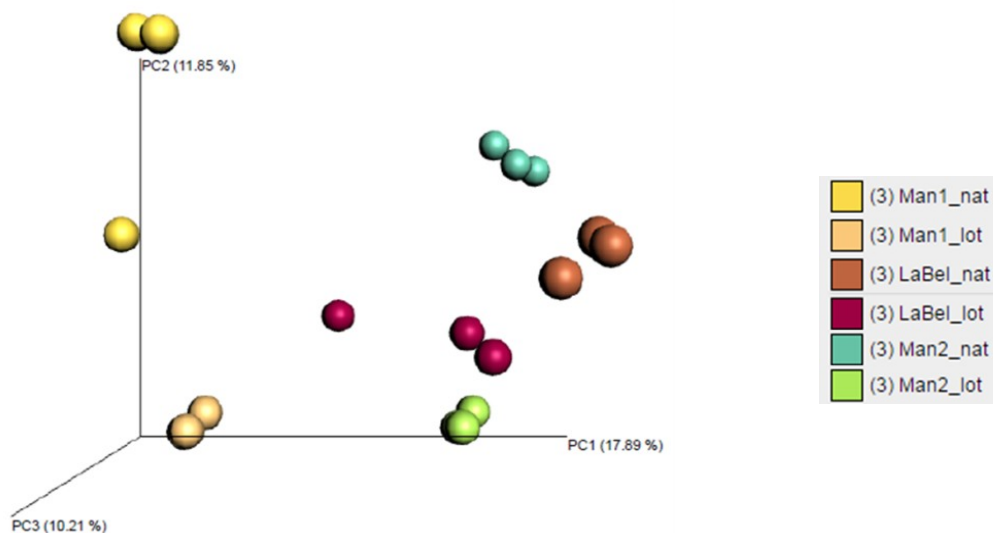
c)



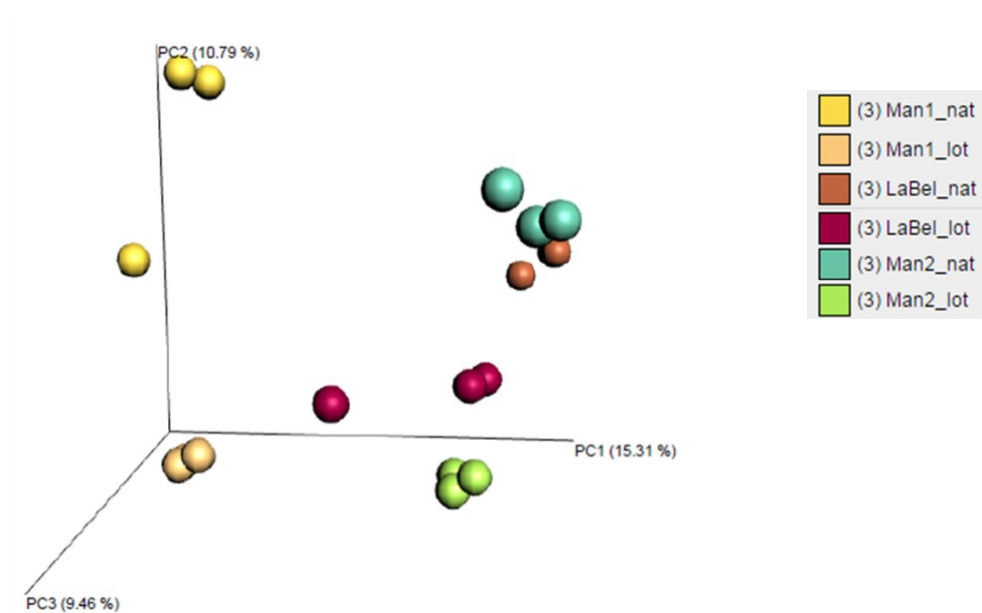
Análisis de Diversidad Beta

Figura N° 2.5: Análisis de Coordenadas Principales en base a las matrices de distancias de a) *Bray-Curtis*; b) *Jaccard*; c) *Weighted UNIFRAC*; d) *Unweighted UNIFRAC*, basados en la información obtenida mediante el agrupamiento en OTUs de las secuencias 18S.

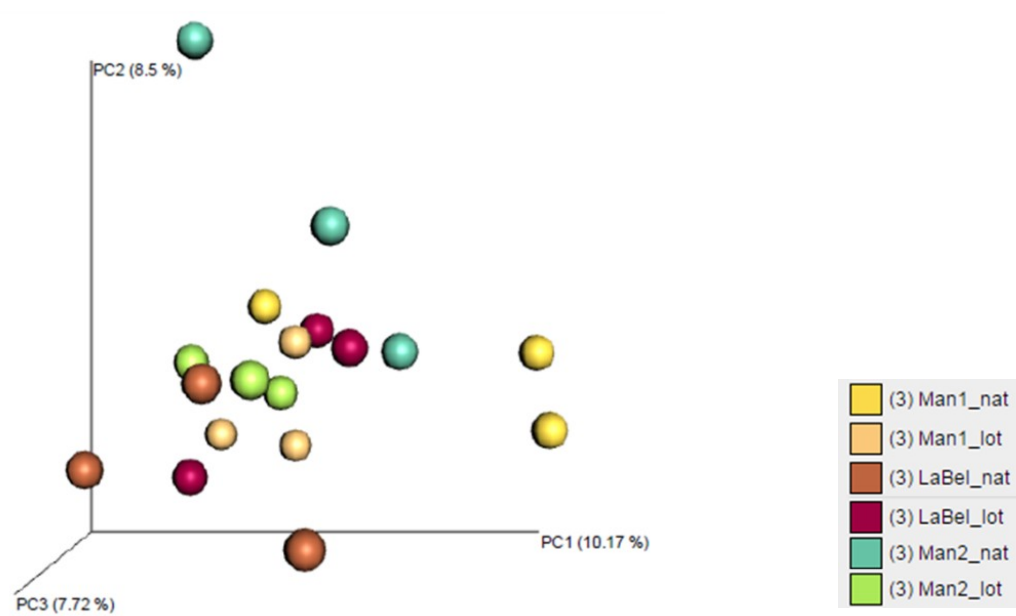
a)



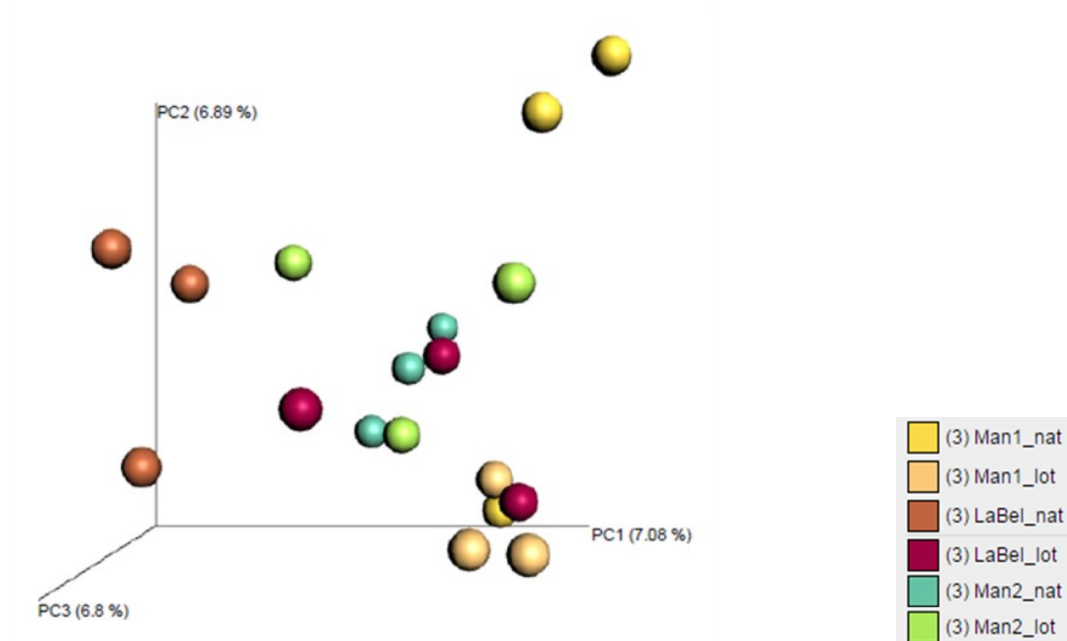
b)



c)



d)



e)

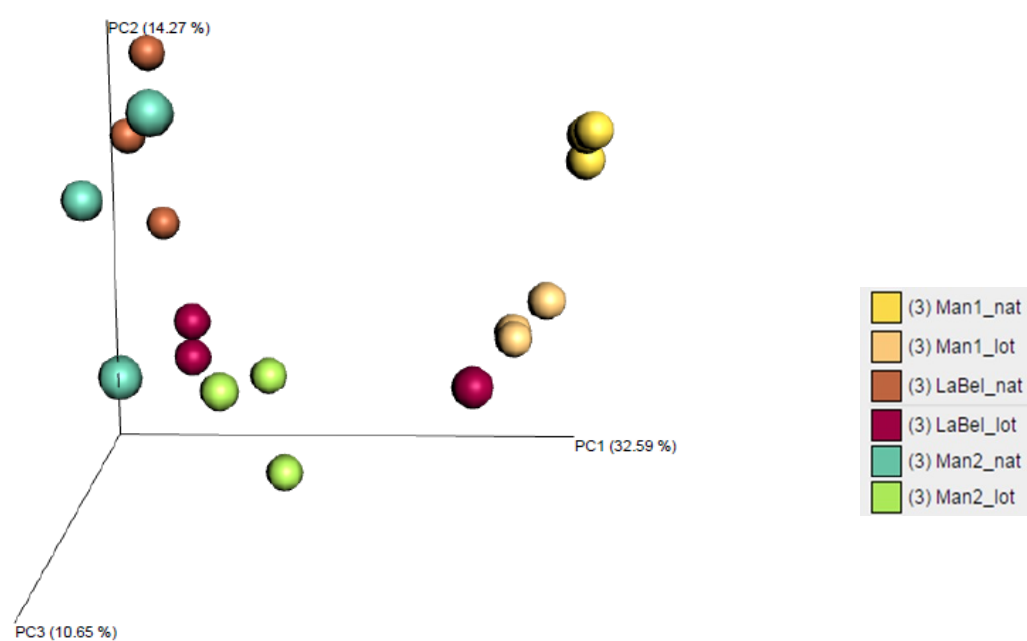


Tabla 2.1. Análisis PERMANOVA (999 permutaciones) considerando sitio y uso del suelo, basado en las matrices de distancias de *Bray Curtis*, *Jaccard*, *Weighted UNIFRAC*, *Unweighed UNIFRAC* y *Raup-Crick*.

PERMANOVA (999 permutaciones)	Categoría	Métrica	Pseudo –F statistic	p-valor
	Sitio	<i>Bray-Curtis</i>	2.4690	0.001
		<i>Jaccard</i>	2.1564	0.001
		<i>Weighted UNIFRAC</i>	1.1718	0.016
		<i>Unweighted UNIFRAC</i>	1.0874	0.004
		<i>Raup-Crick</i>	27.38	0.002
	Uso del suelo	<i>Bray-Curtis</i>	1.9556	0.009
		<i>Jaccard</i>	1.7988	0.003
		<i>Weighted UNIFRAC</i>	1.1002	0.163
		<i>Unweighted UNIFRAC</i>	1.0824	0.029
		<i>Raup-Crick</i>	6.61	0.032

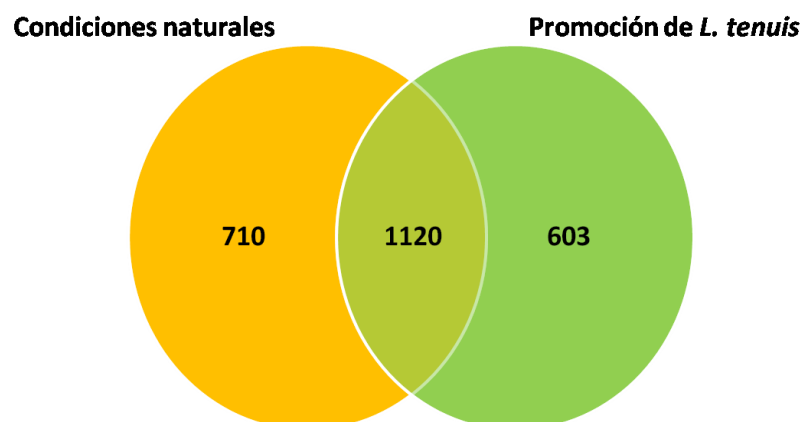
Como se puede observar en la Figura N° 2.5, en el caso de las métricas de *Bray-Curtis* y *Jaccard* puede observarse que las muestras de los suelos se agrupan verticalmente en dos planos, cada uno de ellos correspondientes a las muestras en condiciones de pastizal natural y aquellos colectados en parcelas sometidas a la promoción de *L. tenuis*. Por su parte, en el caso de las métricas UNIFRAC, no se observaron agrupamientos o patrones para Weighted UNIFRAC, pero sí para Unweighted UNIFRAC. El análisis permutacional de la varianza (PERMANOVA) registró diferencias significativas para los tratamientos “Promoción de *L. tenuis*” y “Pastizal natural”. Además, se detectaron también diferencias a nivel del sitio (Tabla N° 2.1). Este resultado se registró para todas las métricas de diversidad beta evaluadas, excepto para el caso de la métrica Weighted UNIFRAC a nivel del uso del suelo.

Composición taxonómica

Dado que se registraron diferencias significativas a nivel de la modificación de la composición florística, en correspondencia con la hipótesis planteada, la composición taxonómica de los OTUs, correspondientes a las secuencias de 18S, fue analizada a nivel de los 2 tratamientos evaluados: promoción de *L. tenuis* y pastizal natural o de “no tratamiento con herbicidas”.

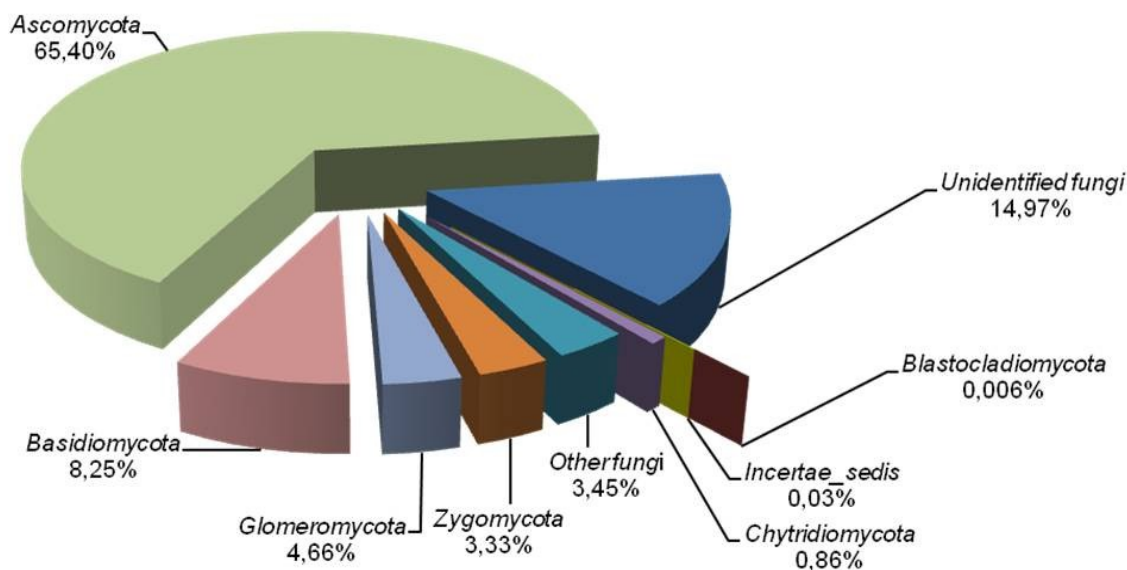
Asimismo, a partir de un diagrama de Venn, se pudo apreciar la cantidad de OTUs correspondientes a cada situación. Desde el punto de vista del tratamiento de promoción, existe aproximadamente la misma cantidad de OTUs que son exclusivos para cada una de las condiciones evaluadas (Figura N° 2.6). Si bien este diagrama sólo refleja la presencia y ausencia de ciertos OTUs en cada tratamiento y no considera la abundancia de cada OTU, brinda una idea de la riqueza específica de la comunidad.

Figura N° 2.6. Diagrama de Venn, en base a los diferentes OTUs obtenidos mediante agrupamiento de las secuencias del gen 18S al 97% de similitud. Análisis a nivel del uso del suelo: Pastizal natural vs. promoción de *L. tenuis*



Como puede observarse en la Figura N° 2.7, el análisis de nivel de phylum de las muestras de suelos de la Pampa Deprimida, muestra que los *phyla* más abundantes pertenecen a *Ascomycota*, seguido en abundancia por hongos que no pudieron ser identificados y luego por aquellos agrupados en el *phylum Basidiomycota*.

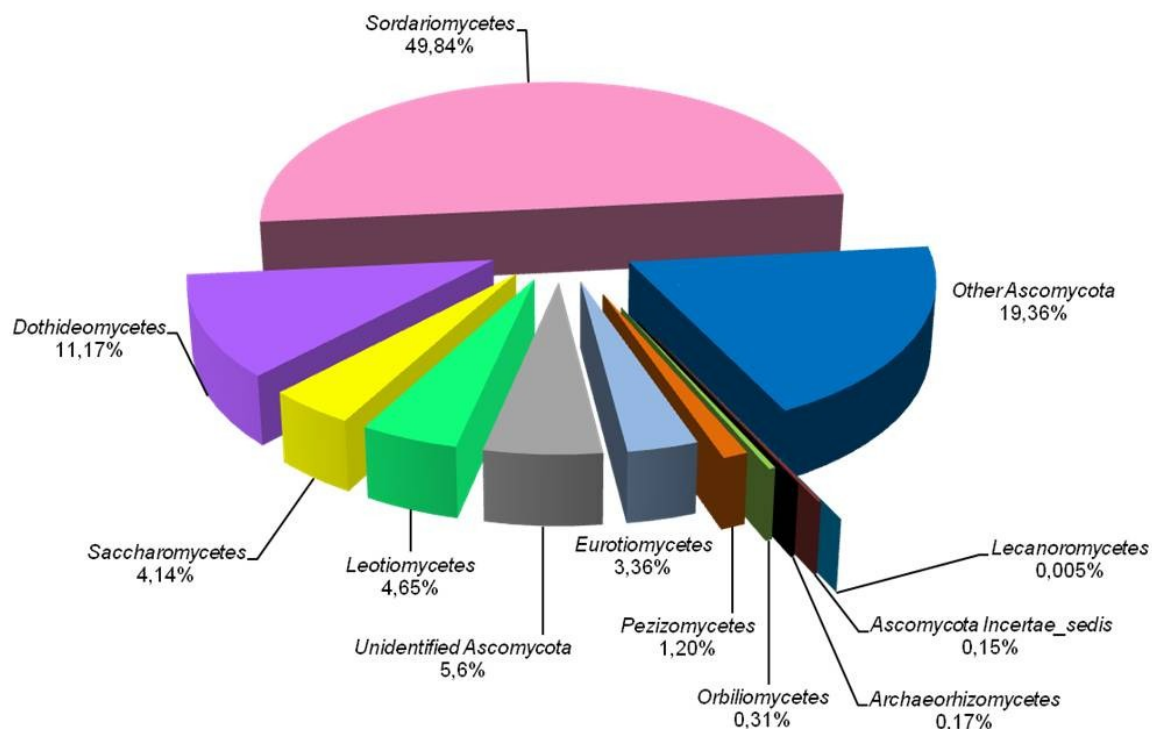
Figura 2.7. Composición taxonómica a nivel de phylum de las secuencias agrupadas en OTUs al 97% de similitud. Identidad taxonómica según la base de datos “UNITE database versión 7.1”. Los valores son referidos al número de lecturas totales del análisis.



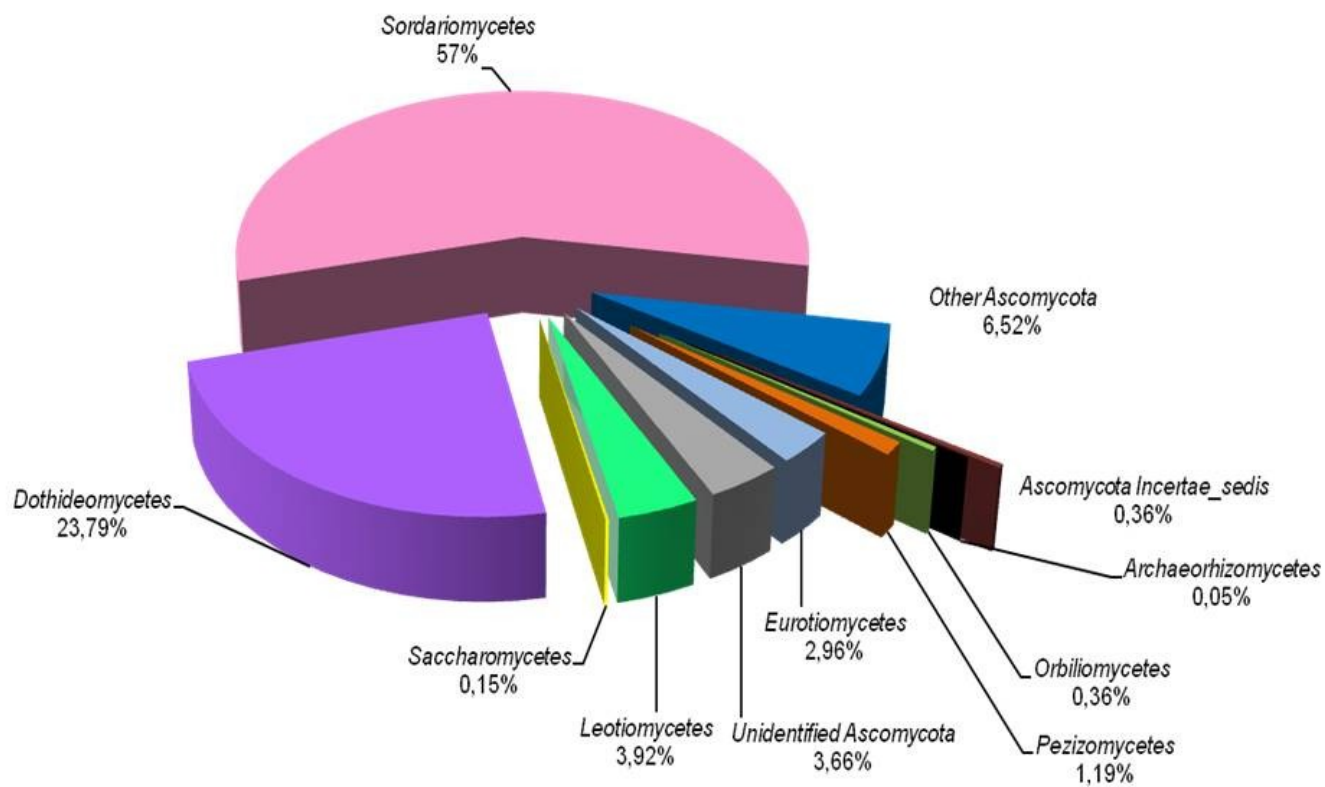
Una vez determinados los mayoritarios se prosiguió con el análisis de las clases de los *phyla* más importantes, teniendo en cuenta la abundancia relativa de los mismos. Dicho análisis permitió determinar que las diferentes clases modificaron su abundancia debido a la práctica de promoción de *L. tenuis*, lo que motivó la posterior discriminación de su composición específica en ambos tratamientos (Figura N° 2.8)

Figura N° 2.8. Clases del *phylum Ascomycota*. Los valores están referenciados al total de la lectura para cada condición de tratamiento: a) Condiciones de no promoción; b) Promoción de *L. tenuis*.

a)



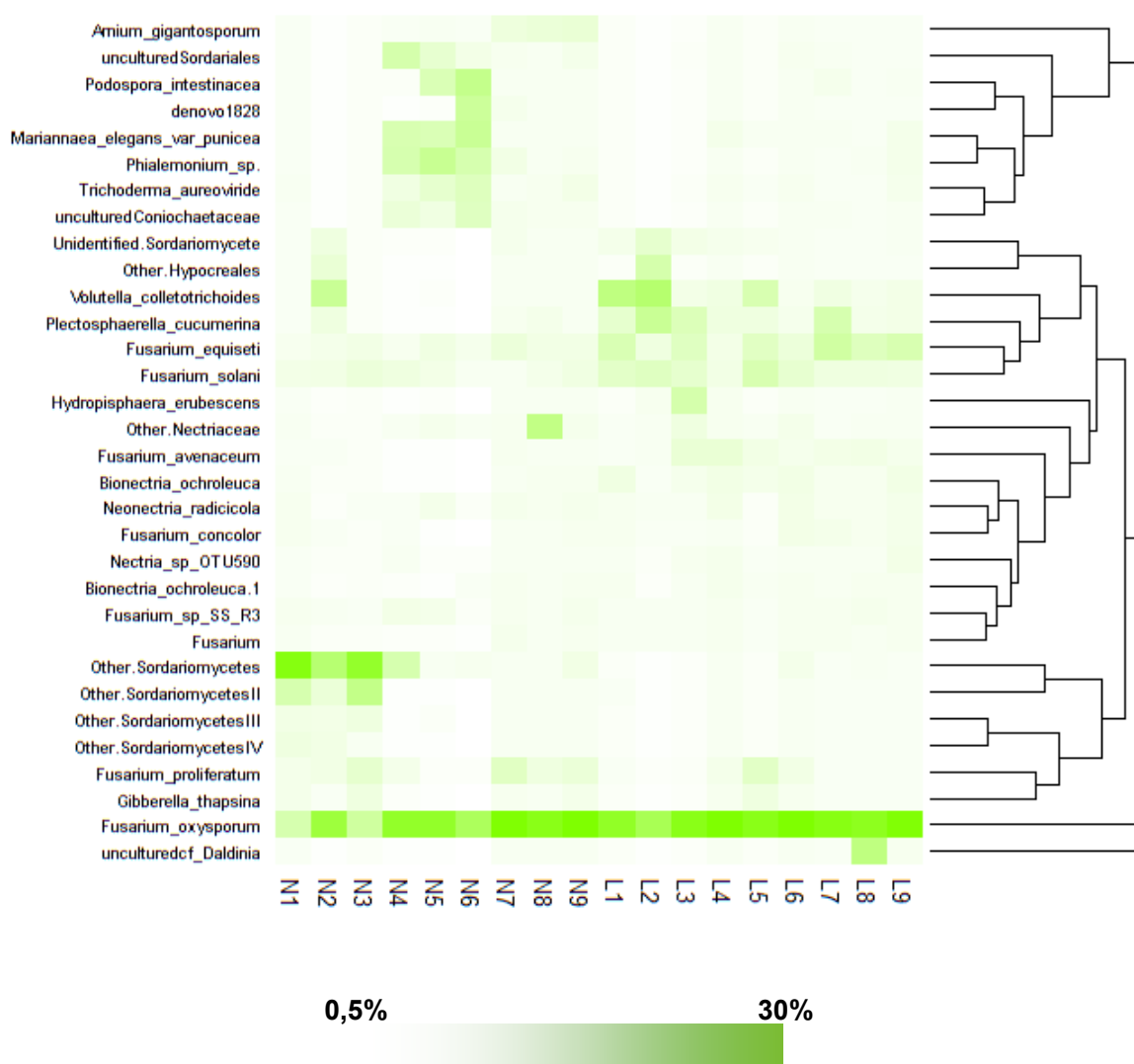
b)



Con posterioridad, se analizaron las composiciones específicas de las clases que modificaron su abundancia con el efecto de la práctica de promoción (Figura N° 2.9), como así también el core mycobiome de cada uso del suelo.

Figura N° 2.9. Heatmap correspondiente a los OTUs pertenecientes a las clases del phylum *Ascomycota* que modificaron su composición, luego de la práctica de promoción de *L. tenuis*. a) Clase *Sordariomycetes*; b) Clase *Dothideomycetes*; “L1-L9”: Muestras correspondientes a suelos bajo la práctica de promoción de *L. tenuis*; “N1-N9”: muestras correspondientes a suelos sin tratamiento de promoción de *L. tenuis*.

a)



b)

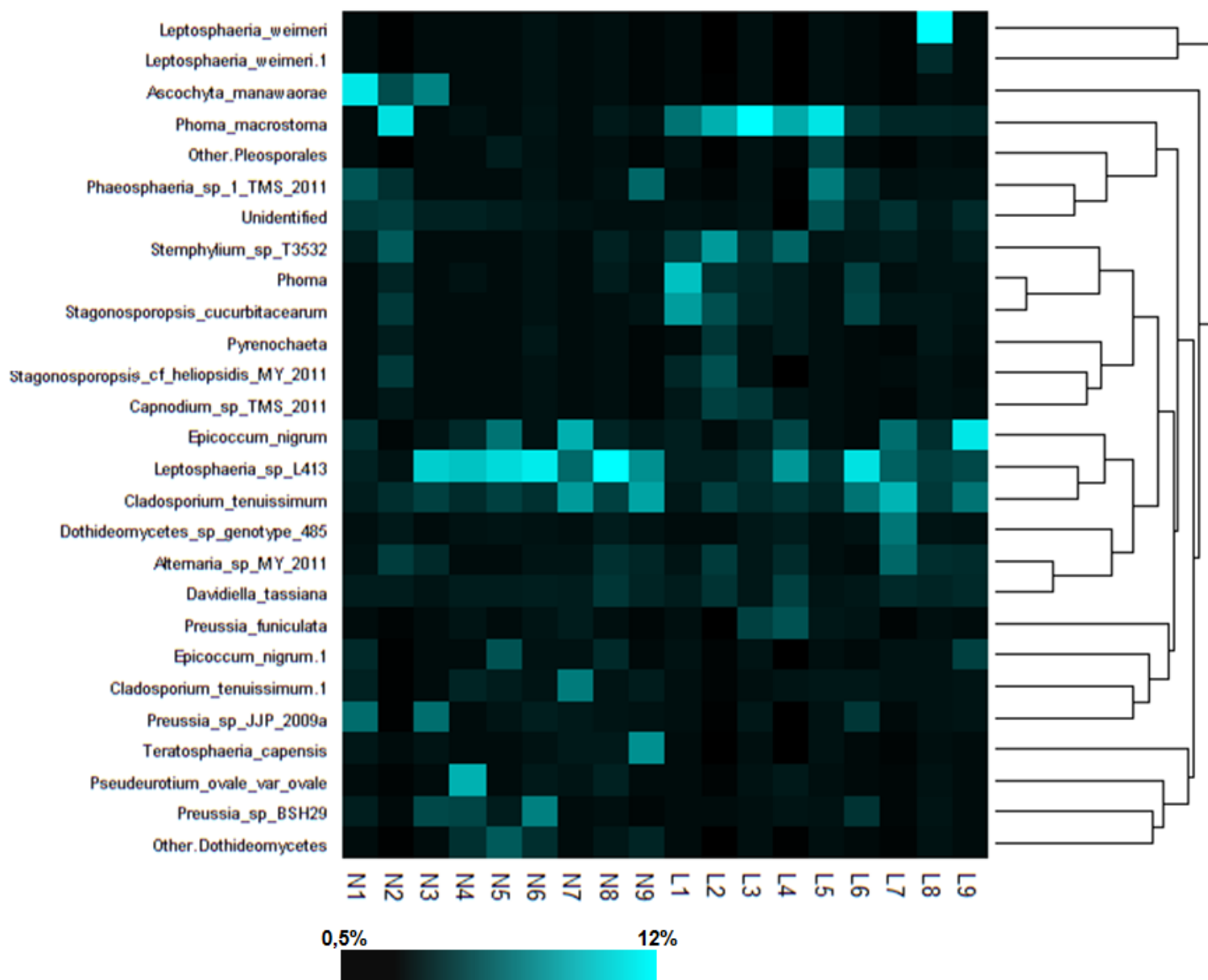
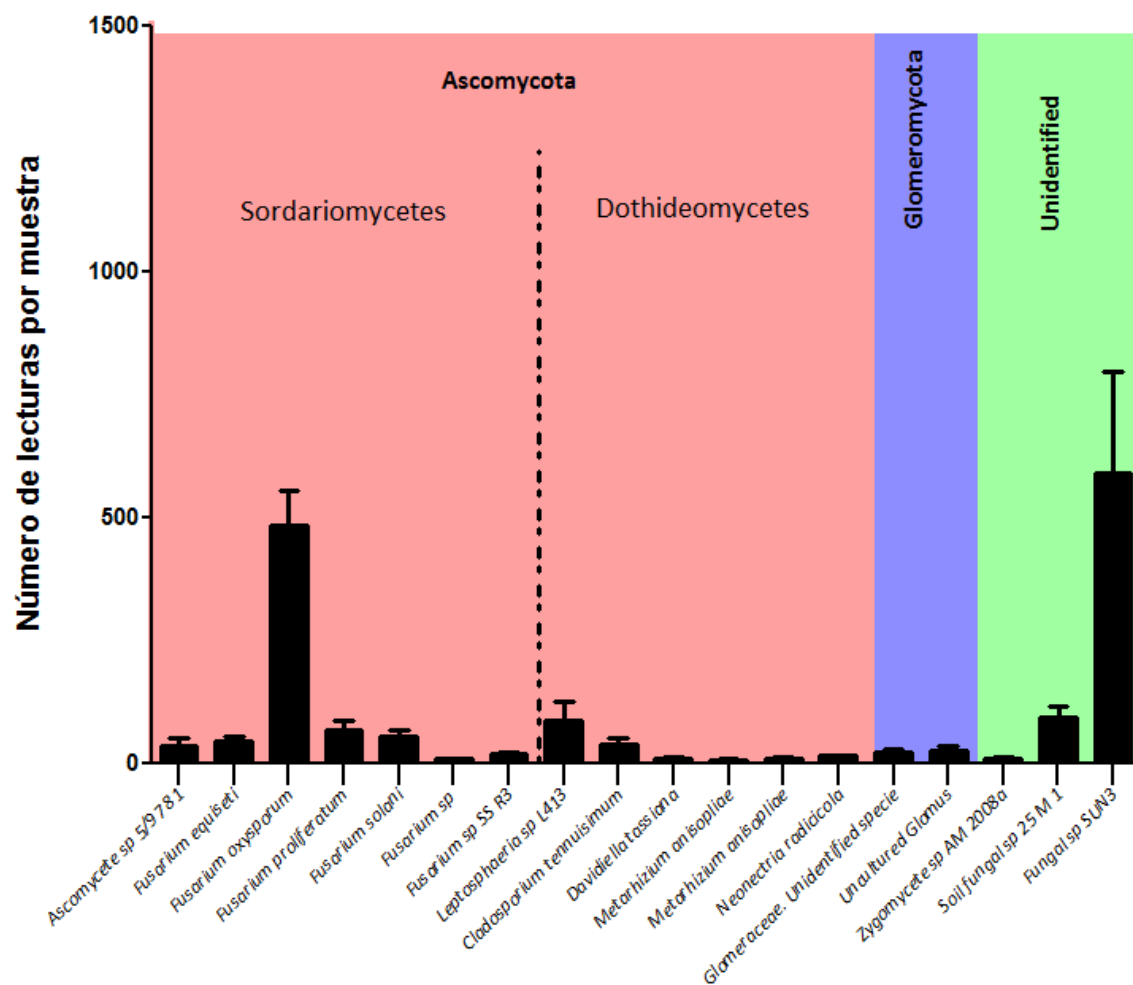
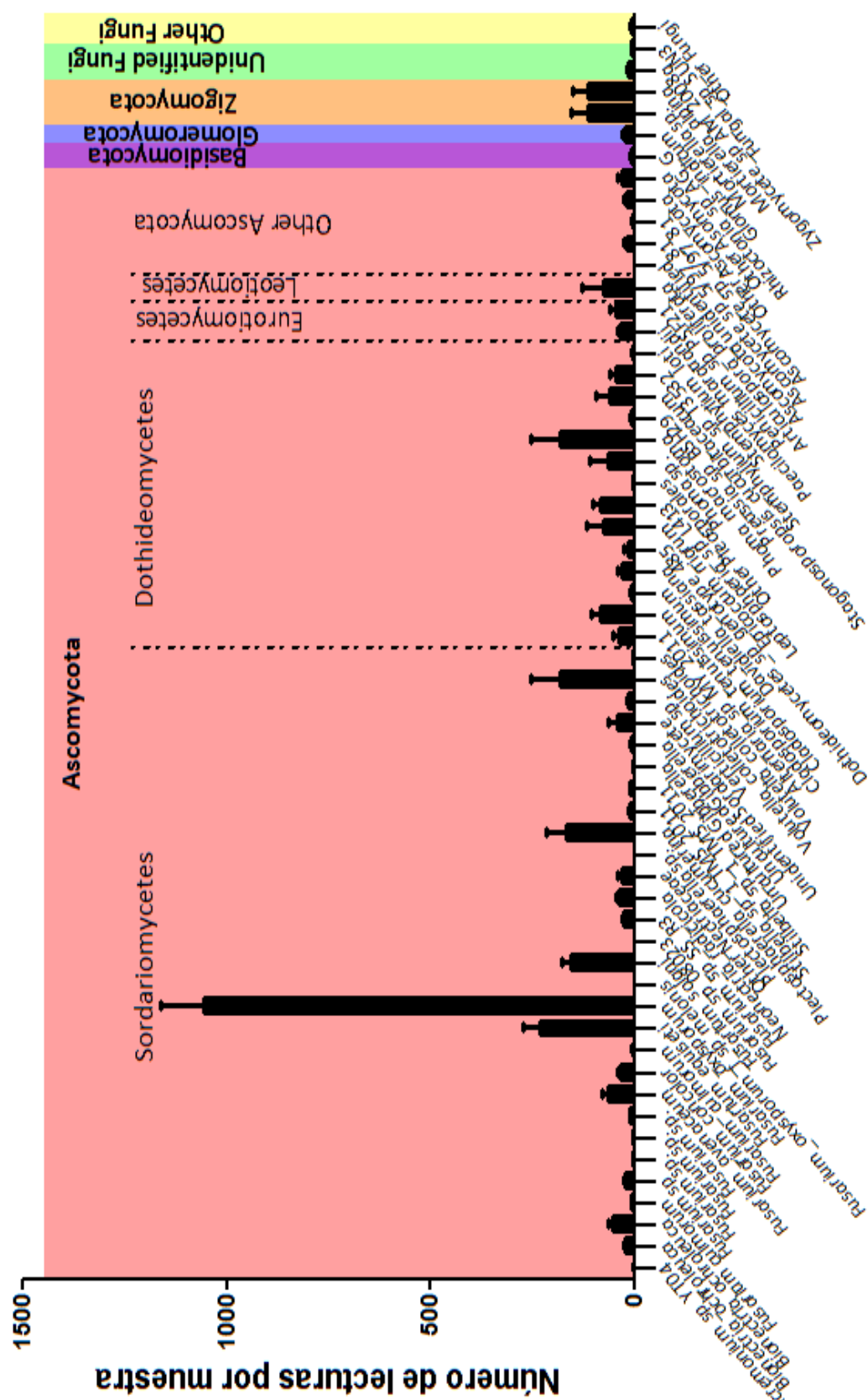


Figura N° 2.10. OTUs miembros del “core mycobiome” para cada condición: a) Condiciones de pastizal natural; b) Promoción de *L. tenuis*.

a)





Relación entre la distribución de la comunidad de hongos y las variables ambientales del suelo con influencia sobre los mismos

Debido a las diferencias detectadas en la estructura de las comunidades fúngicas sometidas a la práctica de promoción de *L. tenuis* en contraste con las comunidades de los suelos en condiciones de pastizal natural; se decidió estudiar en profundidad la relación entre los miembros de la comunidad y las variables ambientales que podrían estar afectando su distribución. Para ello, se determinaron una serie de características básicas, mediante el análisis de las mismas muestras de suelos, de las cuales se obtuvo el material genómico para el estudio de las comunidades mediante secuenciación masiva. Los parámetros analizados y los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla N° 2.2. Los valores de significancia del ANOVA de dos vías se encuentran en la Tabla N° 2.3.

Tabla N° 2.2. Parámetros físico-químicos del suelo, para cada una de las situaciones tratamiento y uso del suelo. Valores de medias \pm Desviación estándar.

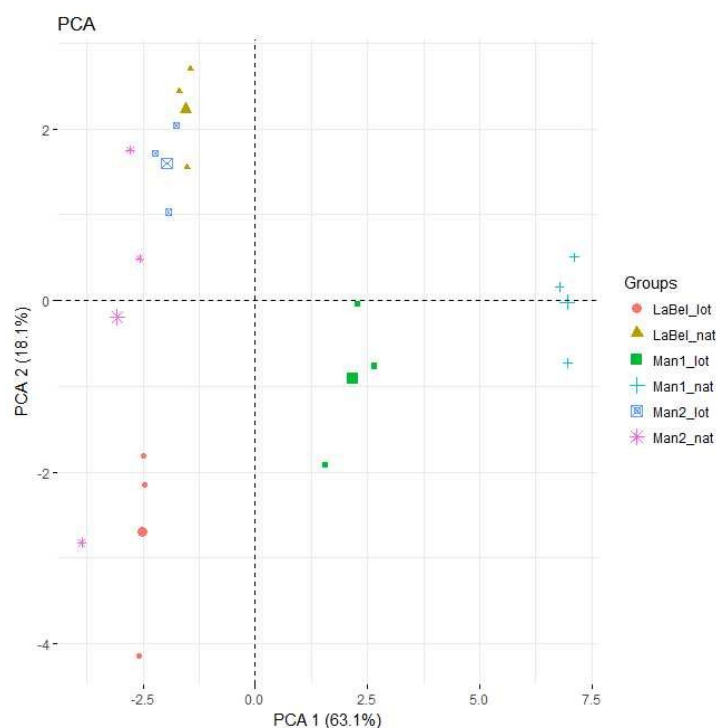
Parámetro	Man1_nat	Man1_lot	LaBel_nat	LaBel_lot	Man2_nat	Man2_lot
CE	6.89 \pm 0.37	3.85 \pm 0.52	0.73 \pm 0.12	0.75 \pm 0.33	0.54 \pm 0.06	1.77 \pm 0.16
pH	8.53 \pm 0.05	8.92 \pm 0.17	6.02 \pm 0.16	6.44 \pm 0.10	6.43 \pm 0.23	6.36 \pm 0.12
Ca	5.63 \pm 0.67	2.67 \pm 0.71	2.20 \pm 0.87	1.53 \pm 0.75	1.37 \pm 0.31	2.17 \pm 0.60
Mg	6.10 \pm 0.10	1.37 \pm 0.06	1.13 \pm 0.38	0.73 \pm 0.40	0.57 \pm 0.06	0.83 \pm 0.21
Na	70.50 \pm 2.42	23.77 \pm 17.55	3.80 \pm 1.51	7.57 \pm 3.04	7.57 \pm 2.27	9.10 \pm 0.89
K	2.43 \pm 0.21	1.43 \pm 0.12	1.07 \pm 0.23	0.53 \pm 0.29	1.37 \pm 1.19	0.93 \pm 0.15
Clo	53.70 \pm 0.46	22.43 \pm 1.15	2.77 \pm 0.49	3.60 \pm 0.72	4.80 \pm 2.34	4.20 \pm 0.89
Sul	24.50 \pm 1.23	7.70 \pm 2.34	1.03 \pm 0.21	0.17 \pm 0.06	0.20 \pm 0.10	0.23 \pm 0.06
Bic	5.73 \pm 0.47	7.87 \pm 1.05	4.27 \pm 0.15	7.10 \pm 2.01	5.77 \pm 2.06	8.63 \pm 0.64
N	0.29 \pm 0.01	0.28 \pm 0.02	0.32 \pm 0.01	0.21 \pm 0.05	0.25 \pm 0.05	0.32 \pm 0.04
CO	3.82 \pm 0.27	3.28 \pm 0.40	3.87 \pm 0.30	2.10 \pm 0.45	2.83 \pm 0.92	3.74 \pm 0.28
MO	6.58 \pm 0.46	5.65 \pm 0.69	6.68 \pm 0.52	3.62 \pm 0.78	4.87 \pm 1.59	6.45 \pm 0.48
AP	11.37 \pm 0.87	8.57 \pm 1.16	5.40 \pm 1.04	6.27 \pm 1.29	2.83 \pm 0.42	4.73 \pm 0.40
C/N	13.17 \pm 0.49	11.63 \pm 1.87	12.10 \pm 0.98	10.17 \pm 0.74	11.10 \pm 1.50	11.83 \pm 0.57
CIC	23.53 \pm 0.78	23.30 \pm 0.36	20.87 \pm 1.66	16.10 \pm 0.92	14.37 \pm 0.57	18.77 \pm 0.95
ex_Mg	6.73 \pm 0.71	5.07 \pm 0.06	3.93 \pm 0.12	2.87 \pm 0.21	2.30 \pm 0.01	3.00 \pm 0.10
ex_Na	9.17 \pm 0.60	6.23 \pm 0.86	0.97 \pm 0.21	3.03 \pm 0.21	1.13 \pm 0.15	1.27 \pm 0.35
ex_K	2.30 \pm 0.20	2.30 \pm 0.17	2.00 \pm 0.17	2.13 \pm 0.15	1.47 \pm 0.06	1.27 \pm 0.35
Ex_Ca	-	-	13.10 \pm 0.61	7.20 \pm 1.11	11.30 \pm 0.36	7.27 \pm 0.31
PSI	38.93 \pm 1.78	26.77 \pm 3.83	4.63 \pm 0.67	18.93 \pm 2.20	7.90 \pm 1.31	6.70 \pm 1.55
RAS	-	-	3.23 \pm 2.00	8.03 \pm 4.66	7.73 \pm 2.31	7.57 \pm 1.19

Tabla N° 2.3. Análisis ANOVA de dos vías para los factores: sitio (Manantiales 1, La Bellaca y Manantiales 2) y uso del suelo (Pastizal natural y Promoción de *L. tenuis*) en todos los parámetros físico-químicos cuantificados. * diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.01$; ns: no significativo para ANOVA $p < 0.05$

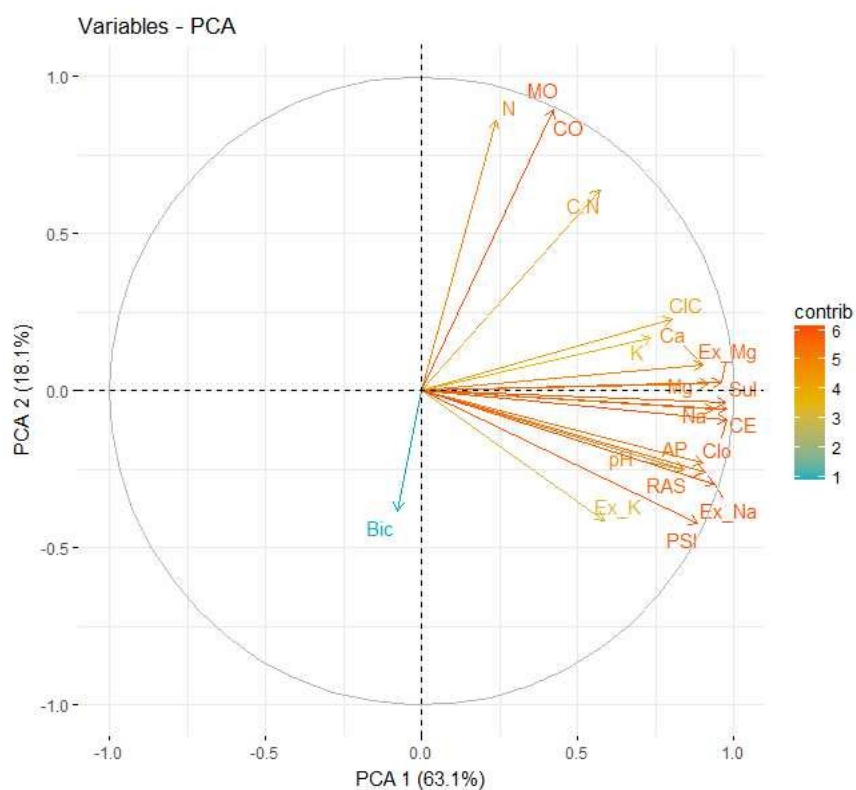
Parámetro	Sitio	Uso del suelo	Sitio x Uso del suelo
CE	*	*	*
pH	ns	*	ns
Ca	*	ns	ns
Mg	*	*	*
Na	*	*	*
K	*	*	ns
Clo	*	*	*
Sul	*	*	*
Bic	ns	*	ns
N	ns	ns	*
MO	ns	ns	*
AP	*	ns	*
C/N	ns	ns	ns
CIC			
ex_Mg	*	*	*
ex_Na	*	ns	*
ex_K	*	ns	ns
ex_Ca			
PSI	*	ns	*
RAS	*	ns	*

Figura N° 2.11. Análisis de Componentes Principales (PCA) para las variables físico-químicas de los suelos de cada una de las muestras evaluadas. Sitios: Man1: Manantiales 1, LaBel: La Bellaca, Man2: Manantiales 2; Uso del suelo: nat: pastizal natural, lot: promoción de *L. tenuis*. a) Distribución de las muestras en los componentes principales 1 y 2 (PCA 1 y PCA 2). b) Distribución de variables en base a la contribución de los autovectores a los componentes principales 1 y 2 (PCA 1 y PCA 2). La escala de colores representa el porcentaje de contribución de los autovectores a los componentes.

a)



b)



El test de Mantel mostró una correlación estadísticamente significativa entre la distribución de la comunidad y los factores ambientales que ejercen presión sobre la misma (Mantel R estadístico= 0.6526; $p=0.01$).

Posteriormente se procedió a establecer correlaciones no paramétricas utilizando el algoritmo de *Spearman*, para determinar la existencia de correlaciones entre cada una de las variables físico-químicas evaluadas y la proporción de OTUs a nivel de *phyllum*. (Tabla N° 2.4). Este análisis permitió observar que todas las variables evaluadas correlacionaron positivamente y de forma estadísticamente significativa con el *phyllum Ascomycota*. Otras correlaciones positivas también se observaron para el *phyllum "Incertae sedis"*. Asimismo, se determinó que las condiciones que correlacionaron positivamente con el *phyllum Ascomycota* lo hicieron de forma negativa para los *phyla Glomeromycota*, *Basidiomycota* y *Unidentified Fungi* (Tabla N° 2.4).

El análisis de Correspondencias canónicas (CCA) demostró que las variables: pH, Bic, K, Na, Ex_K, Ex_Na, Ex_Mg, CIC, C/N, N, Mg, Ca y AP fueron las más representativas para explicar la distribución de las diferentes clases fúngicas resultantes del análisis. Un total de 60.79% de la variación explicada fue representada en las dos primeras variables canónicas (CCA1: 43.31%, $F=21.34$, $p=0.01$; CCA 2= 17.48%, $F=8.64$, $p=0.022$).

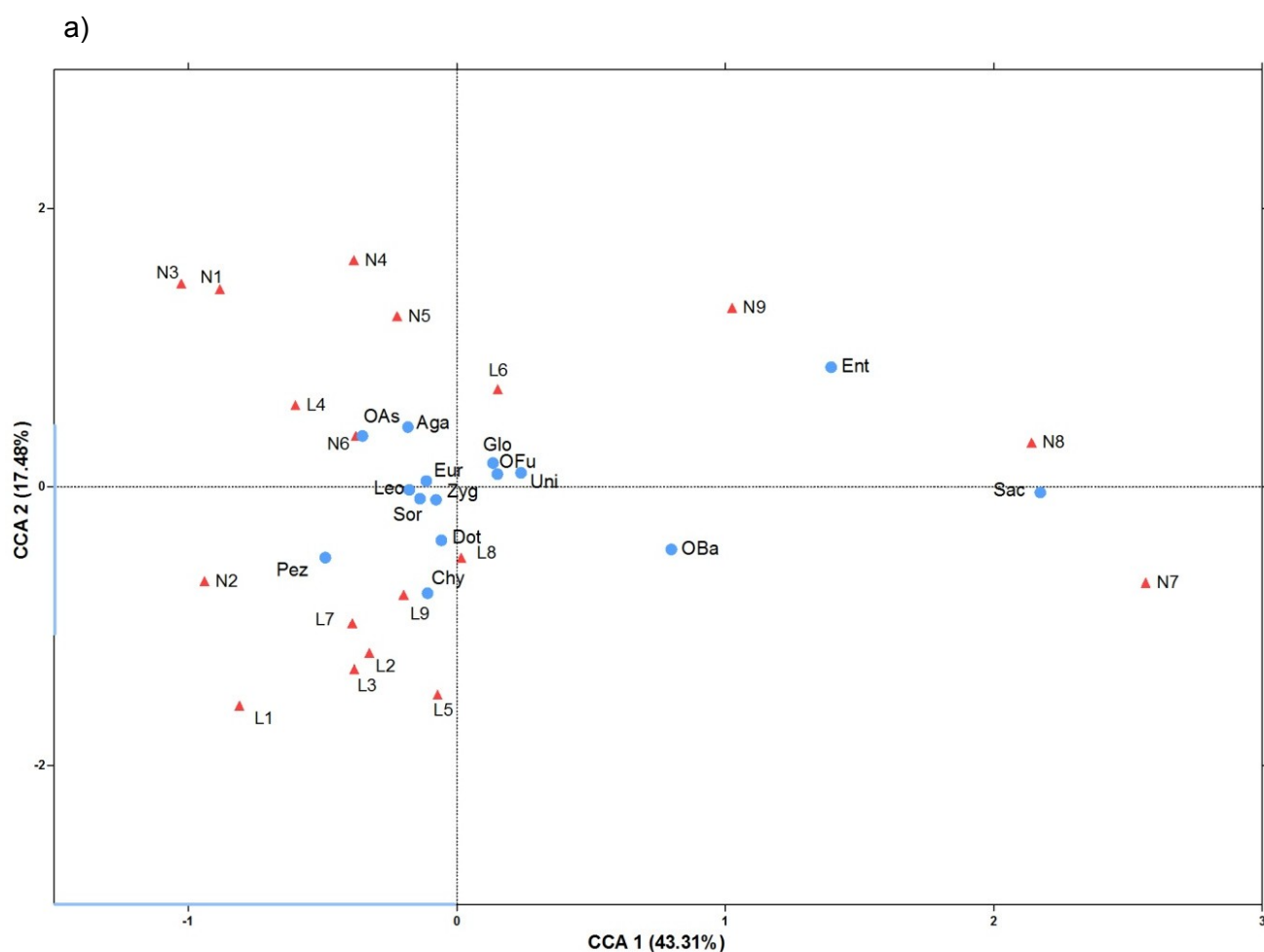
Las variables que resultaron significativas para el modelo (Figura N° 2.12.b) fueron: pH ($F=5.03$; $p=0.004$), AP ($F=5.49$; $p=0.003$), Ca ($F=3.12$; $p=0.027$) y HCO_3^- ($F=2.74$; $p=0.028$).

Los OTUs pertenecientes a la clase *Pezizomycetes* estuvieron relacionados con suelos con elevada CIC y Ex_Na. Las clases *Dothideomycetes* y *Chytridiomycetes* estuvieron relacionadas con elevadas concentraciones de Bicarbonatos, mientras que *Agaricomycetes* y otros *Ascomycetes* estuvieron relacionados con cationes divalentes como Mg y Ca. Por otra parte, las clases *Saccharomycetes* y otros *Basidiomycetes* y *Entorrhizomycetes* estuvieron asociadas con niveles bajos de AP, pH, Bic y Ex_Na en los suelos, como así también asociadas al sitio "Manantiales 2".

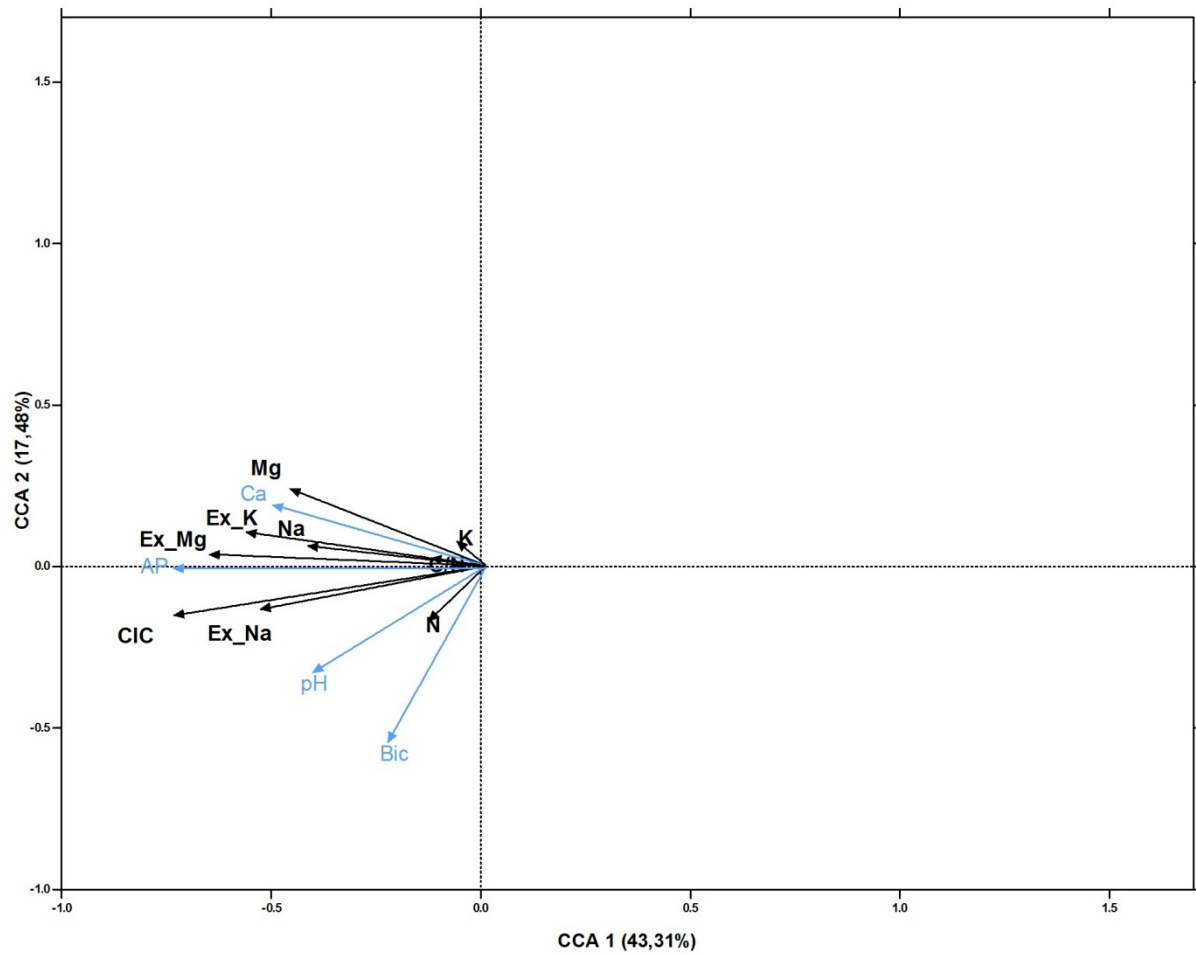
Tabla N° 2.4. Coeficientes de correlaciones de Spearman para las variables físico-químicas del suelo y los OTUs agrupados a nivel de phylum. n/s: Valores no significativos.

Parámetro	<i>Ascomycota</i>		<i>Glomeromycota</i>		<i>Basidiomycota</i>		<i>Chytridomycota</i>		<i>Incertae Sedis</i>		<i>Unidentified</i>	
	<i>Spearman</i>	<i>p-value</i>	<i>Spearman</i>	<i>p-value</i>	<i>Spearman</i>	<i>p-value</i>	<i>Spearman</i>	<i>p-value</i>	<i>Spearman</i>	<i>p-value</i>	<i>Spearman</i>	<i>p-value</i>
CE	0.77	0.001	-0.78	0.001	-0.51	0.03	n/s	n/s	0.58	0.012	-0.78	0.001
pH	0.64	0.008	-0.63	0.009	-0.76	0.00	n/s	n/s	0.47	0.046	-0.51	0.036
Ca	0.44	0.068	-0.49	0.037	n/s	n/s	n/s	n/s	0.60	0.008	-0.51	0.030
Mg	0.51	0.031	-0.47	0.048	n/s	n/s	n/s	n/s	0.59	0.009	-0.62	0.006
Na	0.57	0.013	-0.55	0.018	-0.43	0.07	n/s	n/s	0.71	0.00	-0.53	0.022
K	0.62	0.005	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	-0.67	0.002
Clo	0.83	<0.0001	-0.67	0.002	-0.61	0.007	n/s	n/s	0.60	0.008	-0.76	0.0003
Sul	0.67	0.002	-0.54	0.020	-0.34	0.171	0.55	0.017	0.62	0.006	-0.75	0.0003
Bic	0.26	0.288	n/s	n/s	-0.48	0.041	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
RAS	0.79	0.0001	-0.61	0.006	-0.60	0.008	n/s	n/s	0.69	0.001	-0.73	0.0006
AP	0.60	0.013	-0.65	0.007	n/s	n/s	n/s	n/s	0.49	0.036	-0.71	0.0035
CIC	0.75	0.0003	-0.63	0.005	n/s	n/s	0.53	0.022	n/s	n/s	-0.81	<0.0001
ex_Mg	0.77	0.0002	-0.61	0.006	n/s	n/s	0.62	0.005	0.46	0.053	-0.88	<0.0001
ex_Na	0.63	0.004	-0.54	0.021	-0.62	0.0058	n/s	n/s	0.55	0.017	-0.63	0.0054
ex_K	0.53	0.023	-0.49	0.040	n/s	n/s	n/s	n/s	0.61	0.007	-0.68	0.0020
PSI	0.60	0.013	-0.53	0.028	-0.62	0.01	n/s	n/s	0.63	0.00	-0.58	0.0170

Figura N° 2.12. *Scatterplot* de los dos primeros ejes resultantes del Análisis de Correspondencias Canónicas (CCA), basado en las correlaciones entre la comunidad de hongos a nivel de Clases, presentes en al menos el 0.1% del total de las secuencias. a): Aga: *Agaricomycetes*; Chy: *Chytridiomycetes*; Dot: *Dothideomycetes*; Ent: *Entorrhizomycetes*; Eur: *Eurotiomycetes*; Glo: *Glomeromycetes*; Leo: *Leotiomycetes*; OAs: *Other Ascomycota*; OBa: *Other Basidiomycota* OFu: *Other fungi*; Pez: *Pezizomycetes*; Sac: *Saccharomycetes*; Sor: *Sordariomycetes*; Uni: *Unidentified fungi*; Zyg: *Zygomycetes*; y variables físico-químicas de suelo seleccionadas previamente: b): AP: Fósforo disponible; C/N: Relación Carbono-Nitrógeno; Ca: Calcio; CIC: Capacidad de Intercambio Cationico; Ex_Mg: Magnesio Intercambiable; Ex_Na: Sodio Intercambiable; Bic: Bicarbonatos; Mg: Magnesio; Na:Sodio. Sitios: Manantiales 1 (Man1), La Bellaca (LaBel), Manantiales 2 (Man2). Nat: Pastizal natural; lot: Promoción de *L. tenuis*.



b)



Discusión

El número de secuencias obtenidas en este trabajo de tesis, para el análisis de las comunidades fúngicas, fue similar a otros reportes previos en trabajos de éstas características (Jesús y col., 2016), e incluso superior al obtenido en otros ecosistemas de pasturas (Penton y col., 2013; Sanaullah y col., 2016). Sobre la base de los mismos, fue posible determinar que la composición de la comunidad fúngica difiere en relación a los sitios de colecta, los cuales debido a la escasa distancia entre ellos, asumimos que se encuentran sometidos a similares condiciones ambientales, lo que deja entrever una fuerte dependencia con la composición físico-química de cada uno de ellos. Por otra parte, los estudios realizados en el presente trabajo de tesis, también permitieron determinar que se registraron modificaciones estadísticamente significativas en la diversidad de los OTUs mayoritarios en suelos con presencia de vegetación nativa no modificada, comparadas con aquellos presentes en ecosistemas sometidos a la práctica de promoción de *L. tenuis*. Estos resultados afirman la hipótesis planteada sobre la modificación de la comunidad de hongos de los suelos bajo el efecto del monocultivo de *L. tenuis*. Asimismo, la intensidad del efecto de la modificación de la diversidad fúngica fue dependiente del sitio.

Los índices de diversidad alfa en el sitio Manantiales 1 fueron menores en relación a los otros dos sitios estudiados. Asimismo, las distancias observadas en las construcciones de PCoA, basadas en las métricas de diversidad beta, las cuales fueron comparativamente mayores entre las condiciones promoción y pastizal natural en el sitio denominado Manantiales 1, mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla N° 2.1). Esto podría sugerir que las comunidades fúngicas establecidas en dichos suelos, son “más sensibles” a la práctica de promoción de *L. tenuis*. Aplicando similar concepto ubicaríamos en importancia de afectación relativa a “Manantiales 2” y luego a “La Bellaca”.

El análisis de la métrica *Raup-Crick* indicó que la modificación de la diversidad estuvo dada por fenómenos determinísticos y no estocásticos. Esto significa que la probabilidad de que los sitios pertenecientes a la promoción de *L. tenuis* se agrupen por separado, con respecto a los sitios pertenecientes a las muestras de suelo en condiciones de pastizal natural, está dada por el efecto del uso del suelo (promoción de *L. tenuis*).

En definitiva, a diferencia de lo observado con las comunidades bacterianas (Capítulo 1), nuestras evaluaciones dejaron en evidencia que la presencia-ausencia de determinados

OTUs, sus abundancias y las variaciones filogenéticas de las comunidades fúngicas de los suelos, se vieron influenciadas por el cambio en la composición florística que habita sobre los mismos (Figura N° 2.5 y Tabla N° 2.1).

Es importante destacar que la diferencia significativa observada a nivel de sitio, tiene su correlato con lo observado para las comunidades bacterianas en el sitio Manantiales 1, (Capítulo 1), donde, a pesar de no registrarse diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos “Pastizal natural” y “Promoción de *L. tenuis*”, el análisis de biodiversidad dejó en evidencia una composición significativamente entre los sitios evaluados.

El ordenamiento basado en el PCA muestra diferencias entre Manantiales 1 y los otros dos sitios, en base al componente principal 1 (PCA 1), para los parámetros físico-químicos evaluados (Figura N° 2.11). Adicionalmente existe una diferencia del sitio mencionado, según el uso del suelo (Pastizal natural vs. promoción de *L. tenuis*). Las variables que tiene mayor influencia sobre el sitio Manantiales 1 son CE, variables relacionadas al Na, cloruros y sulfatos. En el caso del sitio La Bellaca, bajo el efecto de la promoción de *L. tenuis* se observó la relación de este sitio con niveles elevados de Bic, en contraposición con bajos niveles de MO y N que también se registraron para La Bellaca. El sitio Manantiales 2, presentó características homogéneas entre los tratamientos evaluados, y similares al sitio La Bellaca, de acuerdo al PCA 1. Estos resultados están en línea con los antecedentes que indican la heterogeneidad de los suelos de la Pampa Deprimida (Batista y col., 2005) y con lo observado en el capítulo 1, donde el sitio Manantiales 1, presentó diferencias en la composición de la comunidad bacteriana con respecto a los otros dos sitios evaluados.

Por otra parte, como ya se ha mencionado, es importante tener en cuenta aquellos estudios previos que han demostrado que la aplicación del herbicida glifosato sobre el suelo, tiene incidencia directa en la sobrevivencia y germinación de esporas de *Glomus* sp. (Druille y col., 2013). Asimismo, en otro estudio realizado sobre plantas de *L. tenuis* bajo la práctica de promoción mediada por glifosato, se pudo demostrar una disminución en el grado de colonización de HMA. (Druille y col., 2013 b).

Es importante tener en cuenta que el análisis realizado en este trabajo de Tesis no es representativo de la biodiversidad de las micorrizas debido a que los cebadores utilizados como marcadores moleculares para posterior secuenciación (ITS), no son aquellos

considerados como apropiados para amplificar este grupo de hongos en particular, lo cual fue previamente reportado por Stockinger y colaboradores (2010) y por Mamet y colaboradores (2017). Para la correcta caracterización del efecto de la promoción sobre la diversidad de HMA será necesario un estudio específico con otro tipo de marcadores.

Por otra parte, los resultados dejaron en evidencia que existen variaciones significativas en los parámetros físico-químicos entre los sitios evaluados y también según el uso del suelo, tornando difícil el establecer un patrón de variación que solo represente y sea atribuible a la práctica de promoción de *L. tenuis*. En este sentido, es importante destacar la heterogeneidad de los suelos de la región, lo cual deriva en que las propiedades químicas, tales como el pH y también la disponibilidad de macro y micronutrientes, puedan variar significativamente en distancias de unos pocos centímetros de un sitio a otro (Papritz y Flüler, 1991). Además, la introducción de *L. tenuis* en ecosistemas donde predominan gramíneas y existe la ausencia de otras leguminosas con aporte forrajero, deriva necesariamente en cambios estructurales en el suelo debido a que las raíces pivotantes modifican la disponibilidad de nutrientes, la infiltración del agua y las modificaciones que se asocian a la secreción de exudados radicales (Van der Putten, 2003).

En este sentido se destaca la importancia de los resultados del CCA, los que demuestran que las variables que tienen mayor influencia en la distribución de la comunidad fúngica en los suelos evaluados fueron los valores del pH, y los niveles del AP y Ca. Esto es coincidente con el análisis global por *amplicon sequencing* de hongos del suelo reportados previamente por Tedersoo y colaboradores (2014). También los resultados de ésta tesis tendrían correspondencia con aquellos que previamente han demostrado que el AP es un buen predictor de la biomasa microbiana (Xu y col., 2013), y que el valor de pH edáfico constituye el factor más importante en la estructuración de la riqueza y abundancia de organismos del Reino *Fungi* en suelos agrícolas (Rousk y col., 2010).

Resulta interesante la observación de que a pesar de que los *Dothideomycetes* constituyen la clase más abundante del *phylum Ascomycota* (Kirk y col., 2012), en el análisis realizado se evidenció que *Sordariomycetes* fue la clase mayoritaria de éste *phylum*. De acuerdo al CCA, la presencia de esta Clase en los suelos está correlacionada con el contenido de Na del mismo, lo cual se encuentra en concordancia con otros estudios que la reportaron en residuos halo-alcalinos (Santini y col., 2015). De acuerdo con un estudio previo, realizado a nivel global en diferentes ecosistemas, la Clase

taxonómica dominante en los suelos de praderas es *Agaricomycetes* (Tedersoo y col., 2014), lo que podría interpretarse como un dato contrapuesto a lo observado en este trabajo de Tesis, dejando en evidencia la importancia que poseen factores tales como el clima, la diversidad de especies vegetales y las diferencias en las propiedades edáficas sobre la composición de la comunidad fúngica. Un ejemplo de ello constituyen las evidencias que sugieren una fuerte preferencia de los organismos fúngicos por el pH ácido, pero es menester destacar que también se ha reportado la existencia de diversidad de hongos con capacidad de crecer en alcalinidad (Nagai y col., 1995), lo cual fue ratificado por los resultados obtenidos en este trabajo en ecosistemas caracterizados por un valor de pH elevado (Tabla 2.1- Sitio Manantiales 1).

Quizás uno de los hechos más destacados de este estudio se relaciona con el incremento de especies fúngicas asociadas al género *Fusarium*, que se asoció a la promoción de *L. tenuis*. Bajo estas condiciones *F. oxysporum* fue la especie que se encontró en mayor abundancia en el análisis. También una elevada abundancia de hongos del género *Fusarium*, ha sido reportada como consecuencia de la ocurrencia de ciclos sucesivos de monocultivo (Dick, 1992). Dicha observación constituye uno de los fundamentos que justifican la utilización de la práctica de rotación de cultivos, lo cual busca evitar la proliferación de enfermedades que tradicionalmente se han asociado a la presencia de cepas del género *Fusarium* (Albarracín-Orio y col., 2016).

Es relevante la observación realizada de que el género *Fusarium* se presentó como dominante en el *core mycobiome*, tanto en los suelos sin historia de tratamiento agrícola como así también en aquellos bajo promoción de *L. tenuis*. La asociación entre leguminosas y organismos del género *Fusarium*, también ha sido reportada tempranamente en producciones de otras leguminosas como *Phaseolus vulgaris* (Domsch y col., 1968) y monocultivo de *Glycine max* (Warren y Kommendahl, 1973).

La mayor asociación descrita en la literatura especializada, para la función ecológica de los organismos pertenecientes al género *Fusarium* en la naturaleza, es ser los causantes de enfermedades por obstrucción vascular y muerte de plántulas durante la germinación de muy diversas especies vegetales (Booth, 1971). Sin embargo, también ha sido observado como organismo endófito, sin la presencia de síntomas ni el desencadenamiento de una enfermedad, durante su colonización. En este sentido, se ha reportado su presencia no patogénica en tejidos de *Senecio vulgaris* y *Centaurea nigra* (Hodgson y col., 2014) y también en *Zea mays* (Bacon y col., 1996), donde por el

contrario, se lo ha asociado con la capacidad de promover el incremento de biomasa, expresado en un aumento del peso seco (Yates y col., 1997). De forma similar, una diversidad de especies de *Fusarium* han sido reportadas de forma asintomática en asociación con tejidos específicos, como por ejemplo las raíces de leguminosas (Haapalainen y col., 2016). En el caso particular del género *Lotus*, existe un reporte previo de la presencia de *F. avenaceum* en raíces de la leguminosa nativa *L. creticus* creciendo en condiciones áridas en la región del Mediterráneo, con capacidad de colonizar los tejidos de manera asintomática (Maciá-Vicente y col., 2008).

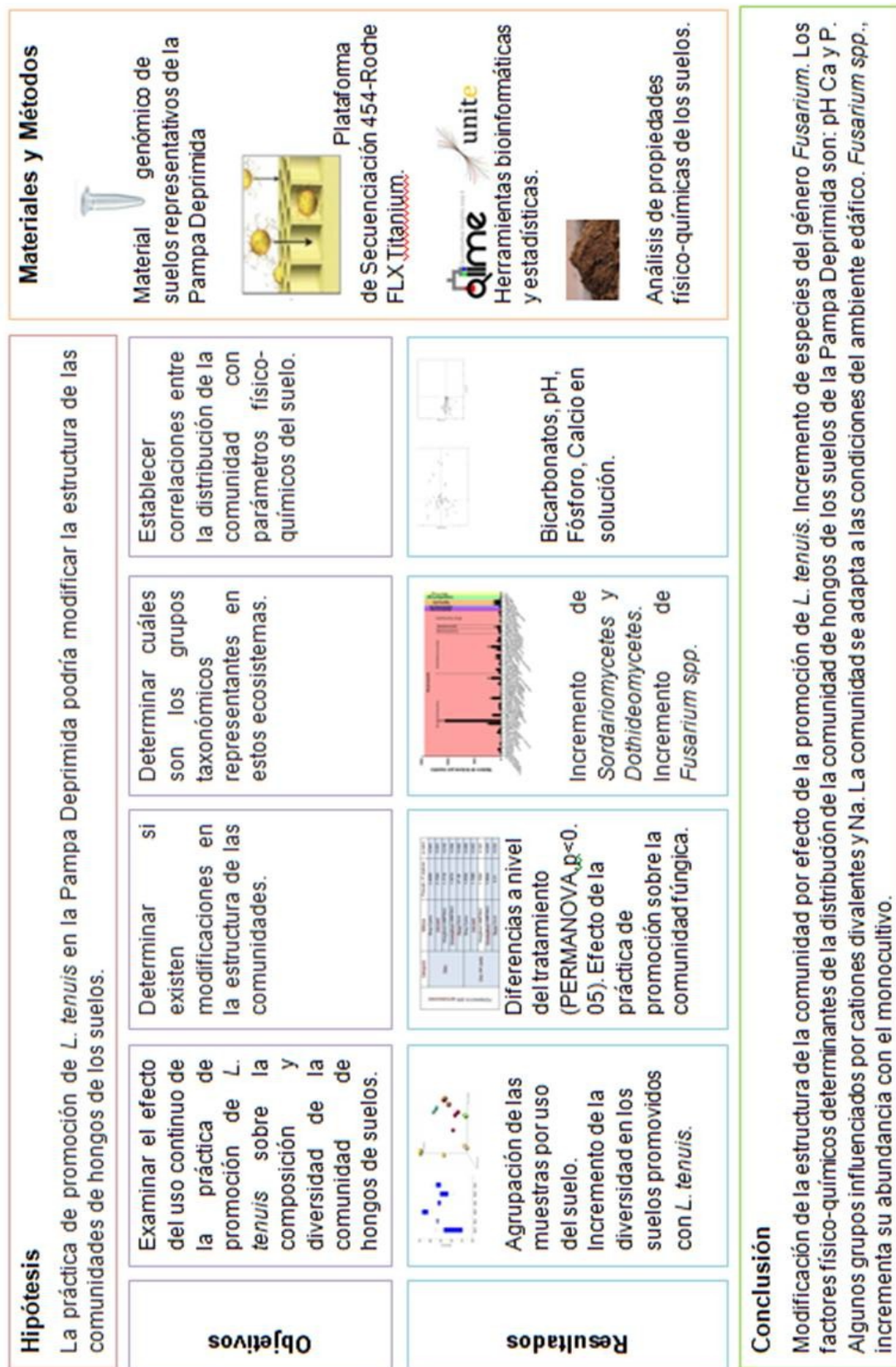
Conclusión

Nuestros estudios han dejado en evidencia que la modificación en la composición florística del paisaje derivado de la mayor presencia del *L. tenuis* tuvo efecto sobre las comunidades fúngicas, incrementándose la biodiversidad.

En base a los resultados presentados en el Capítulo 1 para las comunidades bacterianas y los resultados obtenidos en la evaluación de la biodiversidad de hongos presente en los suelos colectados a partir de los dos tratamientos analizados, se podría sugerir que los organismos del Reino *Fungi* son más susceptibles a los cambios en la composición florística y a los efectos directos e indirectos derivados de la composición físico-química edáfica, los cuales a su vez serían desencadenados como consecuencia de la práctica de promoción.

Asimismo, también el estudio permite inferir que la distribución de las diferentes clases de hongos resulta influenciada principalmente por el contenido de Sodio y el valor de pH edáfico.

Diagrama Resumen – Capítulo 2



Caracterización de aislamientos fúngicos obtenidos de la endorizosfera de *Lotus tenuis* y especies acompañantes, que crecen en suelos de la Pampa Deprimida. Relación con la capacidad solubilizadora de fosfato y tolerancia a condiciones extremas

Introducción

La elevada capacidad que presenta *L. tenuis* para tolerar condiciones abióticas estresantes (Escaray y col., 2012), hace presuponer que los organismos que lo acompañan en el ecosistema, cuentan también con dicha capacidad, ya que tanto bacterias como hongos, presentan crecimiento en un amplio rango de condiciones ambientales (Marulanda y col., 2009; Rajapaksha, 2011; Selvakumar y col, 2017).

Como se mencionó en el capítulo anterior (2), la influencia de los factores abióticos sobre los hongos que habitan en el ambiente edáfico está poco estudiada, en comparación con las bacterias. Entre dichos factores, el pH del suelo es un factor clave, dado que determina la disponibilidad de los nutrientes (Fernández y Hoefft, 2009). En nuestra área de estudio (la Pampa Deprimida), los elevados niveles de pH causados por sales de Na y Ca limitan la disponibilidad de nutrientes como el Fósforo (P) y el Hierro (Fe). Por lo tanto, es esperable que los suelos sódicos presenten una amplia diversidad de hongos alcalófilos y álcali-tolerantes.

El estudio de los organismos rizosféricos es un factor clave a la hora de considerar el mejoramiento de la nutrición fosforada de las plantas, dado que muchos de estos organismos pueden aumentar su disponibilidad en el suelo, influyendo así fuertemente sobre la absorción de P por parte de los organismos vegetales. Los mecanismos por los cuales estos organismos aumentan la disponibilidad del P incluyen la solubilización de formas poco solubles del elemento a través de la liberación de aniones orgánicos ácidos ó protones que modifican el pH del suelo (Illmer y Schinner, 1995) y la mineralización de P mediante la liberación de fosfatasas (Dighton, 1983). Existe un reconocimiento sobre la existencia de un gran número de microorganismos con alta capacidad solubilizadora de P, los cuales podrían ser utilizados como recursos biológicos para la solubilización de fosfato inorgánico del suelo de manera sustentable (Khan y col., 2006). Algunos aislamientos de hongos han sido empleados en ensayos con plantas, donde pudo demostrarse que la inoculación con estos microorganismos, resulta en un aumento del crecimiento y del contenido de P *in-planta*, gracias a su capacidad para solubilizar P inorgánico y/o producir fosfatasas. Un ejemplo de esta capacidad es un estudio realizado por Singh y Reddy (2011) mediante la inoculación de plantas de *Triticum aestivum* y *Zea mays* con una cepa de *Penicillium oxalicum*, comprobándose la capacidad solubilizadora *in-vitro* de la cepa y la promoción del crecimiento de ambos hospedantes, acompañado de un incremento en la concentración de P en los tejidos (Singh y Reddy, 2011).

Numerosos estudios realizados a escala de laboratorio, reportan que diferentes estreses abióticos, incluido el salino, pueden ser atenuados por la presencia de hongos micorrícicos. En 2006, Sannazzaro y colaboradores, reportaron la presencia de hongos micorrícicos colonizando raíces de plantas de *L. tenuis* que crecían en suelos de la Pampa Deprimida. Posteriormente, también se demostró que la simbiosis con el hongo arbuscular *Rhizophagus intraradices* (ex. *Glomus intraradices*) mejoraba el crecimiento de plantas de la leguminosa bajo condiciones de salinidad (Sannazzaro y col., 2006, 2007).

Debido a que los HMA no pueden ser cultivados *in-vitro* (o sin la presencia de una planta hospedante), resulta poco factible que puedan ser empleados en cultivos extensivos. Por este motivo, la posibilidad de contar con hongos endofitos de raíces (diferentes de los hongos vesículo-arbusculares), con la propiedad de tolerar altos niveles de pH y salinidad, sumada a la capacidad de solubilizar fosfato, constituye un elemento de potencial valor biotecnológico.

Organismos endofitos

Estrictamente hablando, un hongo endofito es aquel que puede colonizar tejidos vegetales sin producir daños o síntomas visibles (Petrini, 1986; Carroll, 1988; Wilson, 1995). En este sentido, los hongos micorrícico-arbusculares y los ectomicorrícicos, también formarían parte de esta clasificación, pero existe un número considerable de otros tipos de hongos endofitos. En 2009, Rodríguez y colaboradores propusieron una clasificación de todos los endofitos no micorrícicos, basada en un consenso de diferentes características relacionadas al rango de hospedante, tipo de infección, transmisión, tipo de tejido colonizado, extensión de la infección y los beneficios que otorga al hospedante (Figura N° 3.1). Esta clasificación incorpora además el carácter taxonómico de estos organismos, separándolos en dos grandes grupos principales: Clavicipitáceos y No-Clavicipitáceos. Los endofitos Clavicipitáceos incluyen a la asociación endofítica más estudiada, que involucra especies del género *Neotyphodium* (perteneciente a la clase I de la clasificación de Rodríguez), que colonizan especies de *Festuca* y *Lolium*, donde la producción de alcaloides volátiles desencadena efectos tóxicos en los herbívoros (Bush y col., 1997). En este tipo de interacción se produce la propagación de la infección a través de las semillas, o “transmisión vertical” (Saikkonen y col., 1998), posibilitando tanto la dispersión del hongo, como así también la persistencia de la interacción en términos evolutivos. Los demás hongos endofitos han sido agrupados en las clases II, III y IV, constituyendo a los grupos más ubicuos y menos estudiados. Estos organismos ocupan un amplio rango de

hospedantes, diversos grados de especificidad y funcionalidades ecológicas. En particular, los endofitos de raíces correspondientes a la clase IV, poseen diferentes capacidades de movilizar nutrientes y carbohidratos (Sieber y Grüning, 2006). En algunos casos incluso se ha demostrado su capacidad para movilizar P y mediar en la obtención del nutriente por parte del hospedante (Jumpponen y col., 1998; Barrow y Osuna, 2002).

El presente capítulo ha sido enfocado hacia el estudio de hongos pertenecientes a este último grupo de endofitos.

Figura N° 3.1. Criterio simbiótico utilizado para clasificar los tipos de hongos endofitos, según Rodríguez y colaboradores, 2009.

Criterio	Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV
Rango de hospedante	Acotado	Amplio	Amplio	Amplio
Tejido/s colonizados	Vástagos y rizomas	Vástagos, raíces y rizomas	Vástagos	Raíces
Colonización <i>in planta</i>	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
Biodiversidad <i>in planta</i>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
Transmisión	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Beneficios al <i>fitness</i>	Beneficios no relacionados a la adaptación al hábitat (tolerancia a sequía, promoción del crecimiento)	Beneficios relacionados a la adaptación al hábitat (pH, temperatura, salinidad) y beneficios no relacionados a la adaptación al hábitat (tolerancia a sequía, promoción del crecimiento)	Beneficios no relacionados a la adaptación al hábitat (tolerancia a sequía, promoción del crecimiento)	Beneficios no relacionados a la adaptación al hábitat (tolerancia a sequía, promoción del crecimiento)

Hipótesis

Los organismos fúngicos que habitan en las raíces de especies que crecen sobre suelos típicos de la Pampa Deprimida, tienen capacidad de solubilizar P y de tolerar elevados niveles de salinidad y alcalinidad.

Objetivos

1. Aislar hongos a partir de la endorizosfera de *L. tenuis* y de otras especies que crecen espontáneamente en bajos salinos-alcalinos.
2. Evaluar la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico por parte de las cepas aisladas.
3. Evaluar la capacidad de crecimiento *in-vitro* de las cepas en medios de cultivo con diferentes concentraciones de salinidad y con un amplio rango de pH.
4. Evaluar en qué grado las capacidades de las cepas se encuentran determinadas por el hospedante del cual proceden.
5. Identificar mediante técnicas moleculares las cepas más promisorias por sus características de solubilización y/o tolerancia a condiciones estresantes.

Materiales y Métodos

Sitios de muestreo

La recolección de ejemplares vegetales se llevó a cabo en dos lotes de aproximadamente 10 km² pertenecientes al Campo Experimental del IIB-INTECH (Chascomús), linderos al edificio del Instituto. Ambos lotes se encontraban sin ningún tipo de actividad agrícola al momento de la recolección al menos por los tres últimos años

Recolección

Se extrajeron plantas pertenecientes a los géneros *L. tenuis*, *Atriplex*, *Portulacca* y *Distichlis* mediante el empleo de una pala. Se tomaron plantas al azar, teniendo en cuenta de que los ejemplares seleccionados se encuentren en estado adulto y en buenas condiciones fitosanitarias.

Los ejemplares fueron trasladados inmediatamente al laboratorio, donde las raíces fueron separadas de los vástagos.

Aislamiento de cepas fúngicas

Las raíces fueron lavadas a fondo con agua corriente para liberarlas de restos del suelo, secadas con papel absorbente y cortadas en segmentos de 1 cm. Los segmentos fueron sometidos a sucesivos lavados con:

1. Alcohol 50°, 1 minuto.
2. NaClO - H₂O destilada estéril, 1:10, 3 minutos.
3. Enjuagues sucesivos con agua destilada estéril.

Las raíces fueron cortadas en secciones de aproximadamente 1 cm de largo y dispuestas en placas de Petri con medio de cultivo Agar-Agua (MAA) al 0.5 % suplementado con 2 mg/l de gentamicina.

Un control de desinfección fue realizado con el agua del último lavado, para corroborar la desinfección de la superficie del tejido, sobre medio de cultivo Agar Papa Dextrosado (APD).

Las placas fueron incubadas a 30°C en la oscuridad durante 30 días y controladas diariamente para registrar la aparición de micelio emergiendo de los extremos de las secciones de raíces. El micelio emergente fue repicado a una placa de Petri con medio de cultivo APD e incubado bajo las mismas condiciones durante una semana, para luego proceder a su almacenamiento. La primera letra en la denominación de las cepas corresponde a la inicial del género de planta de la cual se la aisló.

Almacenamiento

Las diferentes cepas fueron almacenadas de tres maneras:

- En placas de Petri con medio APD a 4°C.
- En agua destilada estéril a 4°C dentro de tubos de 2 ml.
- En glicerol-agua destilada estéril 10% a -80°C, en tubos de 2 ml.

Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico

Cultivo de los aislamientos

La evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico, se realizó en tubos de 50 ml que contenían 20 ml del medio de cultivo *National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium* (NBRIP; Nautiyal, 1999) suplementado con 10 gramos adicionales de glucosa. La composición del medio de cultivo NBRIP es la siguiente:

Glucosa.....2.5 gr.
Ca₃PO₄.....5 gr.
MgCl₂.6H₂O.....5 gr.
MgSO₄.7H₂O.....0.25 gr.
KCl.....0.2 gr.
(NH₄)₂SO₄.....0.1 gr.
Agua destilada.....1000 ml

La elección de este medio obedece a que el mismo permite evaluar de manera cuantitativa, la cantidad de P, en forma de H₃PO₄ en medio líquido, y que además de ser un medio químicamente definido, no posee fuentes alternativas de P (como ocurre con el extracto de levadura). El motivo de la suplementación con 10 gramos adicionales de

glucosa está fundamentada en la composición de medios de cultivo generales para el crecimiento de hongos, donde la cantidad de hidratos de carbono es superior. De esta manera se estarían cubriendo los requerimientos carbonados del microorganismo.

Como inóculo se utilizó un bloque de medio de cultivo APD, el cual contenía micelio en activo crecimiento de cada una de las cepas obtenidas por previo aislamiento. Como control, se utilizaron tubos con el mismo medio de cultivo, pero inoculados con un bloque sin micelio.

Los tubos fueron incubados a 30°C en oscuridad, durante 7 días en agitación. Al finalizar el periodo de incubación, se colectaron alícuotas de 1 ml del medio de cultivo para la cuantificación de fosfato tricálcico.

Cuantificación de la biomasa fúngica producida durante el período de incubación

El micelio resultante de la incubación fue filtrado al vacío a través de papel tipo “*Whatman*”, previamente secado en estufa a 70°C durante 48 horas, rotulado y tarado.

Cada disco de papel con el micelio filtrado fue dispuesto en bandejas y secado en estufa a 70°C durante 72 horas. Posteriormente se pesaron en balanza analítica y por diferencia se determinó la biomasa producida. El medio de cultivo filtrado, fue utilizado para la determinación del pH final.

Cuantificación del fosfato inorgánico solubilizado a partir de Fosfato tricálcico.

Se midió por espectrofotometría la reacción colorimétrica del complejo azul de molibdeno, de acuerdo al método de Murphy y Riley (1962). Para ello se tomó 1 ml de medio NBRIP del cultivo del hongo y se lo centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. La reacción colorimétrica se llevó a cabo mediante el agregado a 50 µl del sobrenadante, 790 µl de agua destilada y 160 µl de la solución “Reactivo Mezcla”. Dicha solución se prepara a partir de una solución denominada “Reactivo A”, más el agregado de $C_6H_8O_6$.

El reactivo A contiene, por cada 250 ml:

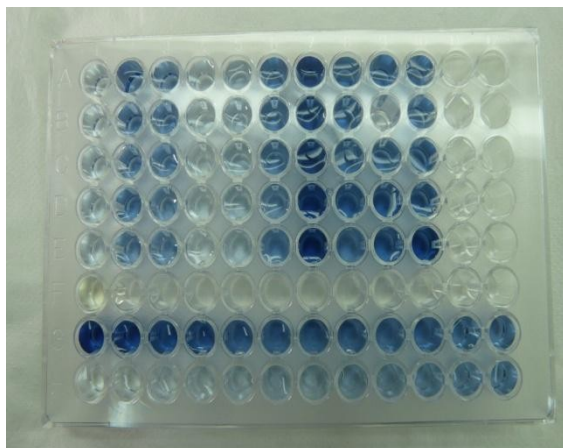
- 125 ml de solución de H_2SO_4 2.5 M
- 37.5 ml de solución de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ a una concentración del 4%.

- 12.5 ml de solución de tartrato de potasio y antimonio ($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$) a una concentración de 0.29%.
- 75 ml de agua destilada.

El *Reactivo Mezcla* contiene 5.28 mg de $C_6H_8O_6$ por ml.

La reacción colorimétrica fue llevada a cabo en placas *multiwell*. Se realizó una curva de calibración, utilizando concentraciones variables de una solución de 10 ppm de K_2HPO_4 . Luego de preparar las reacciones en cada pocillo de la placa, se realizó una incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta la aparición de la coloración azul (Figura N° 3.2)

Figura N° 3.2. Apariencia de la reacción obtenida mediante $Mo(PO_4)_2$ en combinación con H_3PO_4 en placa *multiwell*.



La intensidad de la coloración fue cuantificada mediante un espectrofotómetro (*Synergy TM H1, BIOTEK*) a una longitud de onda de 882 nm.

Evaluación de la tolerancia por parte de las cepas fúngicas a diferentes concentraciones de salinidad por NaCl

La evaluación se realizó en placas de Petri de 9 cm de diámetro, que contenían medio de cultivo APD (3.9%) suplementado con diferentes concentraciones de NaCl. Las soluciones de APD y de NaCl fueron esterilizadas en autoclave separadamente (121°C durante 15 minutos) y mezcladas bajo flujo laminar, hasta alcanzar concentraciones finales de NaCl 0, 100, 150 y 200 mM.

En el centro de la placa de Petri, se colocó un disco de 5 mm de diámetro de medio de cultivo APD, el cual contenía micelio en activo crecimiento. Se sembraron 5 placas de Petri por cada cepa (5 réplicas), por cada tratamiento. Las mismas fueron incubadas a 30°C en la oscuridad durante 7 días.

Las imágenes de cada una de las placas de Petri fueron capturadas mediante un escáner y analizadas mediante el software *Image J* versión 1.4.7. Al finalizar el periodo de incubación, se calculó el área de crecimiento fúngico sobre la placa de Petri. Los valores fueron expresados en cm².

Evaluación de la capacidad de crecimiento según el pH

Medios de cultivo

Para evaluar la capacidad de crecimiento de los aislamientos en un rango que va desde la acidez (pH 5) hasta la alcalinidad (pH 11). Se preparó medio de cultivo Agar Malta Peptonado (AMP) con el suplemento de diferentes soluciones tampón. El medio de cultivo base (AMP) se preparó al 900 ml de agua destilada, utilizando 100 ml de agua para preparar la solución tampón, completando 1 litro de medio de cultivo (Tabla N° 3.1). Las concentraciones de cada solución corresponden a los procedimientos detallados por Nagai y colaboradores (1995). Ambas partes se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se mezclaron bajo flujo laminar. Para proceder a su distribución en placas de Petri, previamente se corroboró el pH de cada medio agarizado, mediante cintas indicadoras de pH.

Composición del medio de cultivo Agar Malta Peptonado (AMP).

- Extracto de malta.....30 gr
- Peptona.....5 gr
- Agar.....15 gr
- Agua destilada.....900 ml

Tabla N° 3.1: Soluciones tampón utilizadas para estabilizar el pH de cada uno de los medios de cultivo preparados para diferentes pH finales.

pH	Medio base (900 ml)	Soluciones tampón (100 ml)
5	AMP	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O
6	AMP	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O + NaH ₂ PO ₄
7	AMP	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O + NaH ₂ PO ₄
8	AMP	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O + NaH ₂ PO ₄
9	AMP	Na ₂ CO ₃ + NaHCO ₃
10	AMP	Na ₂ CO ₃ + NaHCO ₃
11	AMP	Na ₂ CO ₃

Para la inoculación de los aislamientos, su incubación y la medición del crecimiento se procedió tal como se explicó previamente para la evaluación de la tolerancia a la salinidad.

El pH ó rango de pH en el que se presentó mayor crecimiento fue considerado como pH óptimo y se aplicó la clasificación propuesta por Nagai y colaboradores (1995): las cepas que no crecieron a pH 10 y 11 fueron clasificadas como alcalofóbicas; las que crecieron a pH 10, fueron clasificadas como álcali-tolerantes y las que crecieron por encima de pH 10 pero no a pH 5 y 6 fueron clasificadas como alcalofílicas.

Identificación de los aislamientos más promisorios por su alta capacidad para solubilizar fosfato y tolerar elevados niveles de pH y salinidad.

La identificación molecular de los aislamientos seleccionados se realizó mediante el análisis de la secuencia del fragmento correspondiente al espaciador interno transcripto del inglés *Internal Transcribed Spacer* (ITS), del gen ribosomal 18S, obtenido mediante la reacción de cadena de la polimerasa. Para ello se emplearon los cebadores universales ITS5: 5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG'3; (White y col., 1990) e ITS4: 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC '3; (White y col., 1990). Para un volumen final de 25 µl: 1.5 µl MgCl₂ (25mM), 2.5 µl de tampón de reacción (10x), 0.2 µl de taq polimerasa, 0.2 µl de dinucleótidos trifosfato (10mM), 1 µl de cebador ITS5 (0.5 µM), 1 µl de cebador ITS4 (0.5 µM) y 17.6 µl de agua de calidad *MILLI Q*.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

- 94°C – 5 minutos.
- 38 ciclos de:
 - 94°C- 30 segundos.
 - 53°C- 30 segundos.
 - 72°C- 45 segundos.
- 72°C- 10 minutos.

En el caso de las cepas correspondientes al género *Fusarium*, que por amplificación del fragmento ITS no pudieron ser determinadas a nivel de especie, fueron evaluadas a través de la amplificación del fragmento α 1- Factor de elongación, del inglés α 1- *Transcription Elongación Factor* (TEF), mediante la utilización de los cebadores EF1: 5'ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC'3 y EF22: 5'AGGAACCCTTACCGAGCTC'3, (Geiser y col., 2004). Para un volumen final de 25 μ l: 1.5 μ l MgCl₂ (25mM), 2.5 μ l de Tampón de reacción (10x), 0.2 μ l de taq polimerasa, 0.2 μ l de dinucleótidos trifosfato (10mM), 1 μ l de cebador ITS5 (0.5 μ M), 1 μ l de cebador ITS4 (0.5 μ M) y 17.6 μ l de agua *miliq.*

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

- 94°C – 5 minutos
- 38 ciclos de:
 - 94°C- 45 segundos
 - 56°C- 30 segundos
 - 72°C- 2 minutos
- 72°C- 10 minutos

Los fragmentos obtenidos fueron enviados a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar, para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el software MEGA versión 6 y contrastadas con las bases de datos de *NCBI*, *UNITE database* y *Fusarium ID*.

Análisis de los datos

Para evaluar en qué medida se vieron afectados los aislamientos obtenidos en su crecimiento, se efectuaron regresiones lineales de este parámetro sobre la salinidad y el pH.

Con el fin de agrupar los aislamientos en función de su capacidad para crecer a la máxima concentración de sal, el máximo pH, y de su capacidad para solubilizar fosfato, se realizó un PCA.

Para determinar si el efecto de las variables estudiadas sobre el crecimiento de las cepas permite discriminar entre las mismas de acuerdo al hospedante del cual proceden, se realizó un análisis de discriminantes con todas las variables estudiadas (pH, NaCl y solubilización de fosfatos).

En todos los casos se empleó el paquete estadístico Infostat versión 2009 (Di Rienzo, 2009).

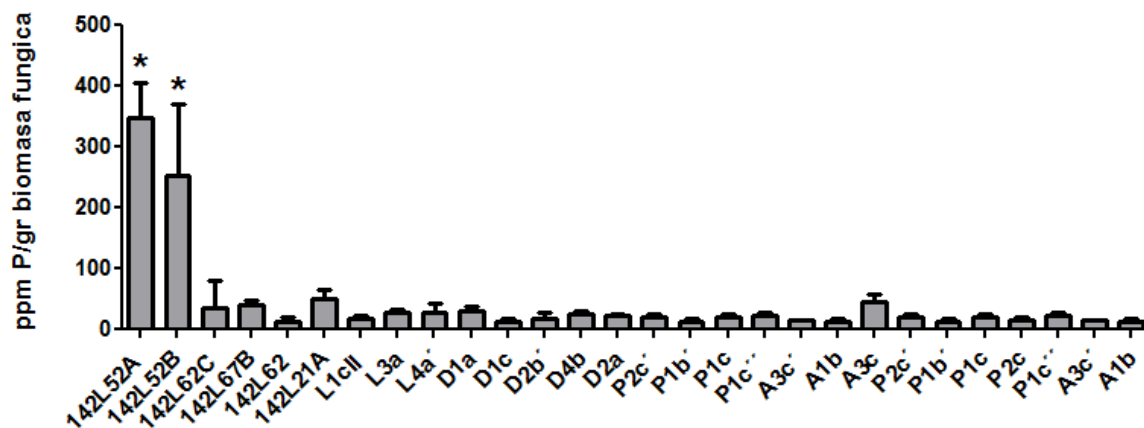
Resultados

A partir del aislamiento realizado en raíces de plantas que crecen en los suelos de la Pampa Deprimida, se obtuvieron en total 21 cepas fúngicas: 9 aisladas de *L. tenuis*, 5 aisladas de *Distichlis* sp., 4 aisladas de *Portulaca* y 3 de *Atriplex*.

Capacidad de las cepas para solubilizar fosfato

La Figura N° 3.3, muestra el desempeño de las cepas como solubilizadoras de fosfato. En ella se puede observar que las cepas 142L52A y 142L52B presentaron valores de solubilización significativamente superiores a los del resto de los aislamientos.

Figura N° 3.3 Valores de solubilización de fosfato expresados en ppm P por gramo de biomasa fúngica producida, luego de un periodo de 7 días de incubación. * indica diferencias significativas respecto del control según ANOVA ($p < 0.05$)

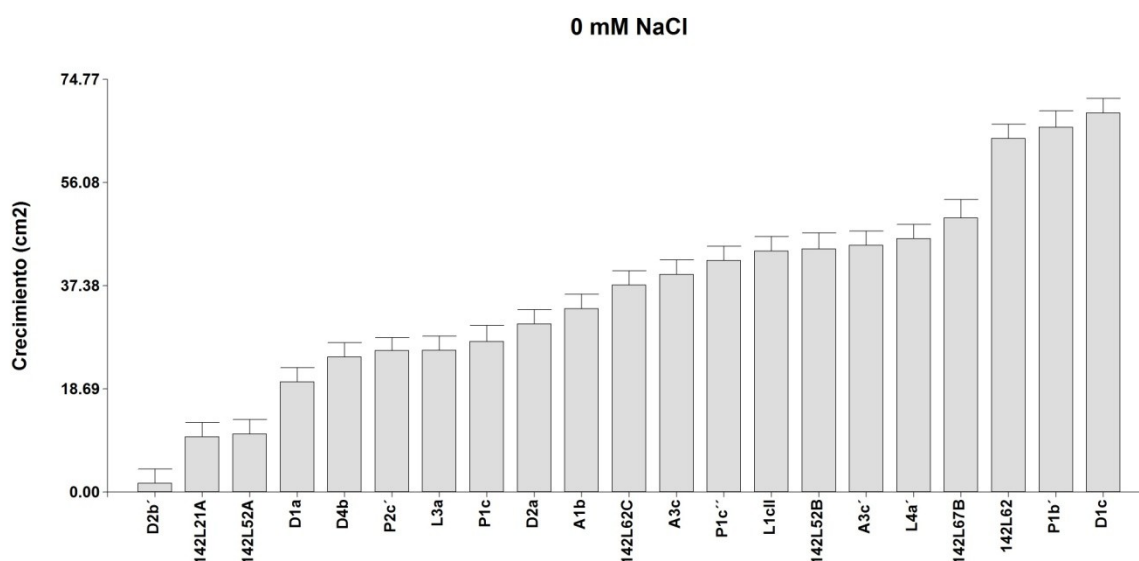


El resultado de un análisis de correlación de *Pearson* entre los valores de solubilización y la diferencia entre pH final y pH inicial del medio sobrenadante (Δ pH) luego del período de incubación, indicó que no existe correlación lineal entre la capacidad solubilizadora de pH y el descenso del pH del medio de cultivo (Δ pH) como consecuencia del crecimiento fúngico ($P < 0.05$).

Tolerancia de los aislamientos a niveles crecientes de NaCl

Los resultados muestran que todas las cepas crecieron aún a 200 mM (Figura N° 3.4). Sin embargo el crecimiento fue muy diferente entre cepas. Así se observó que el aislamiento identificado como D1c constituyó la que más creció, independientemente de la concentración salina, en tanto que aquella identificada como 142L21A presentó el comportamiento contrario.

Figura N° 3.4. Crecimiento de cada una de los 21 aislamientos evaluados (expresado como área de crecimiento en cm^2) en APD adicionado con 0, 100, 150 y 200 mM de NaCl, luego de un periodo de incubación de 7 días. Aislamientos obtenidos a partir de raíces de *L. tenuis*, *Atriplex* spp., *Distichlis* spp. y *Portulaca* spp.



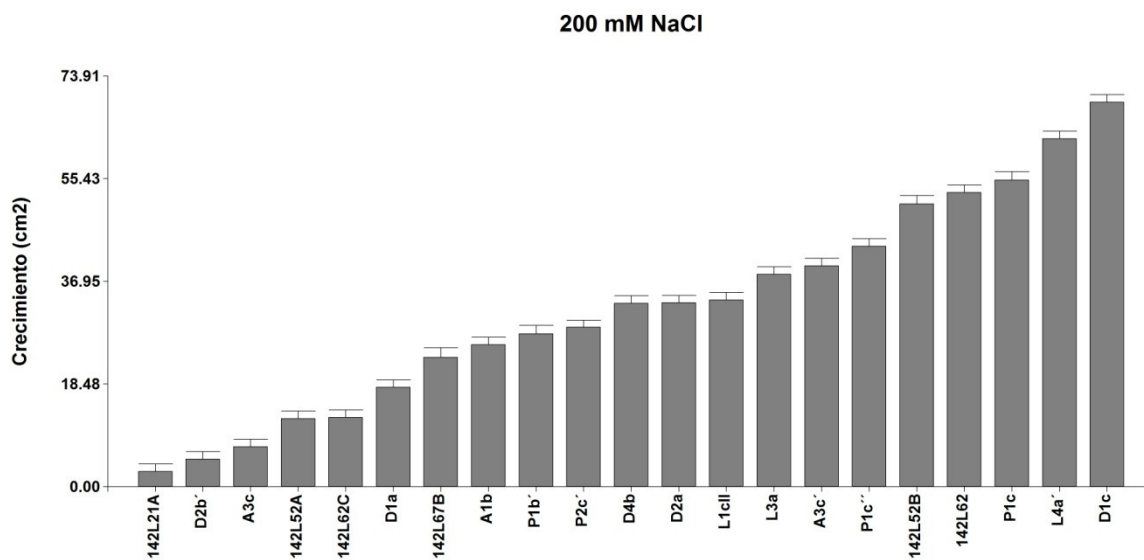
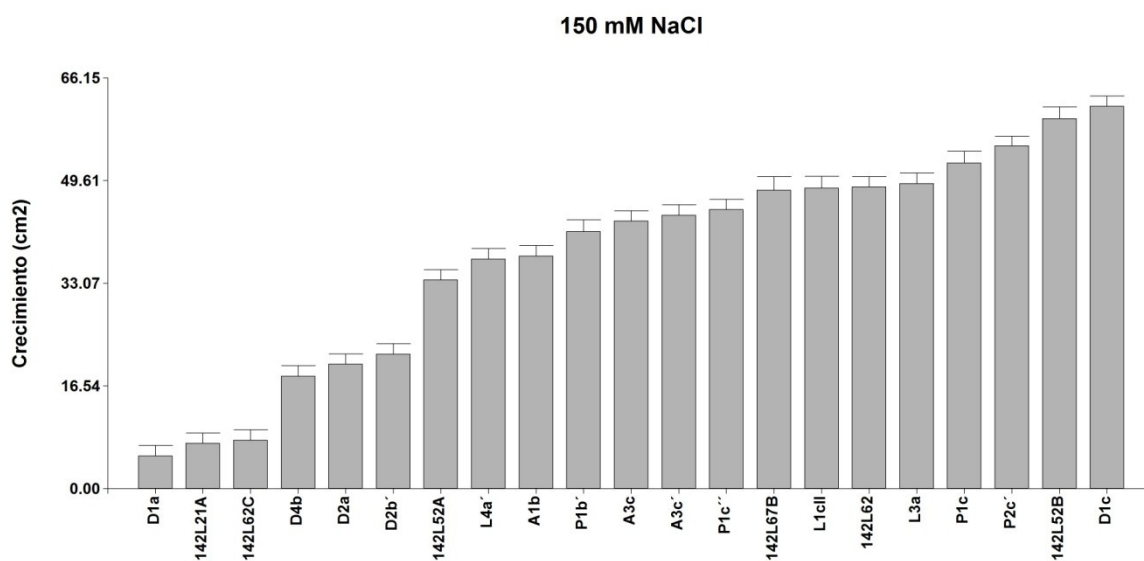
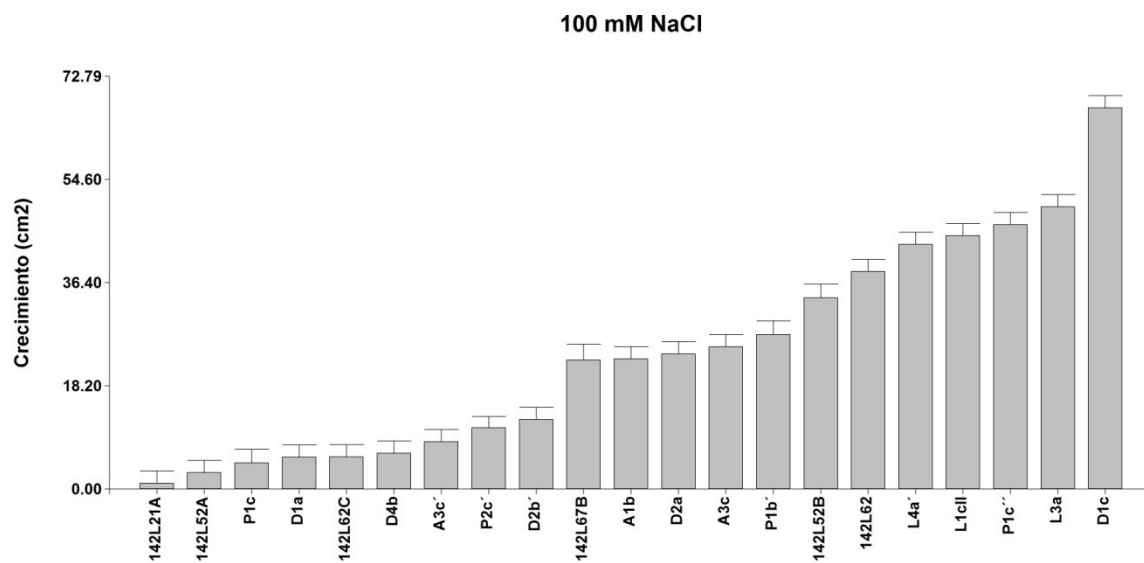
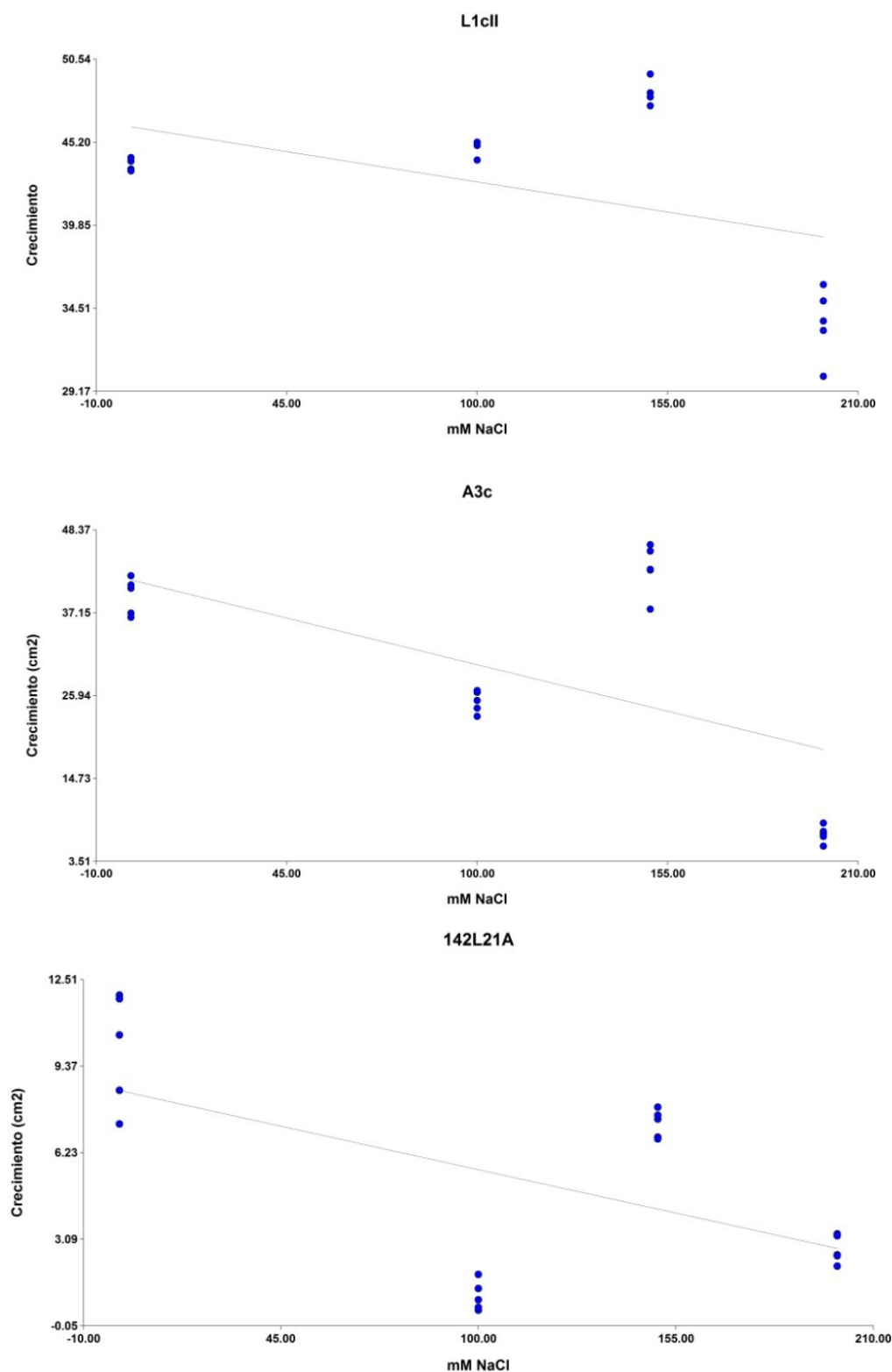
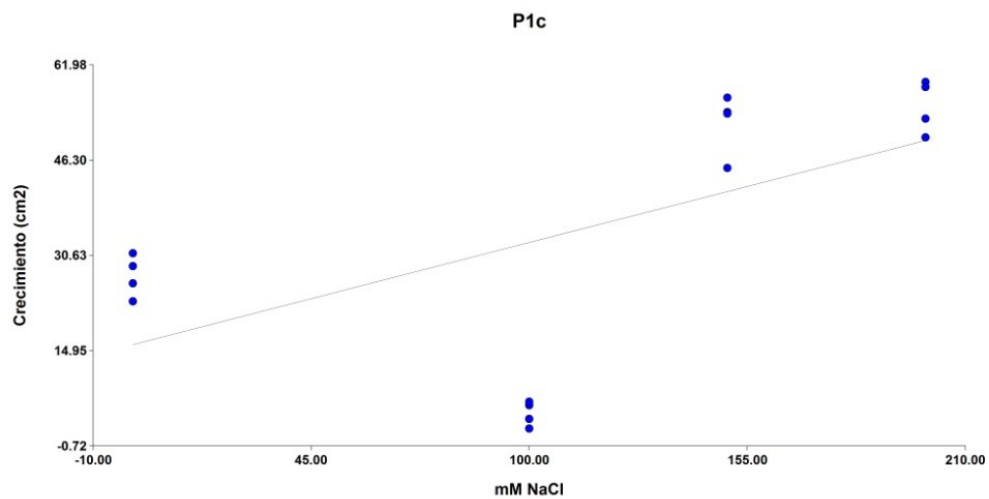
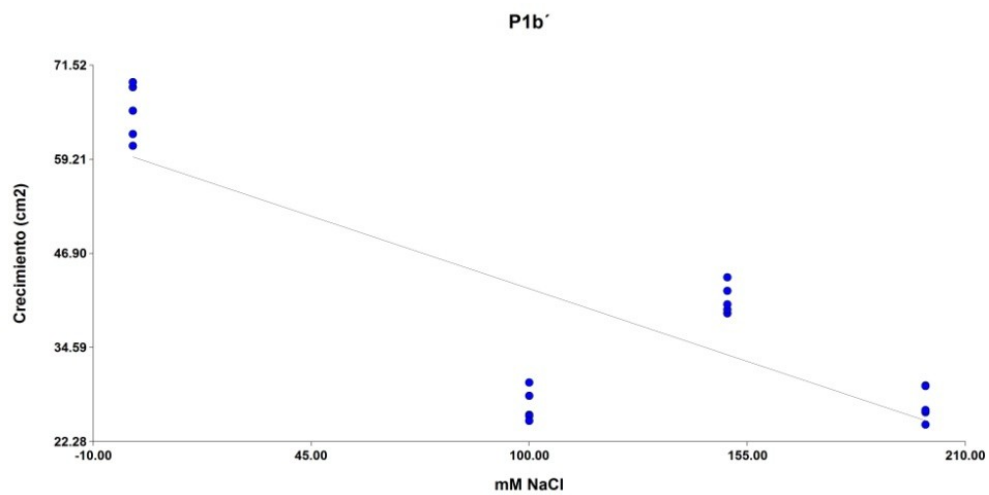
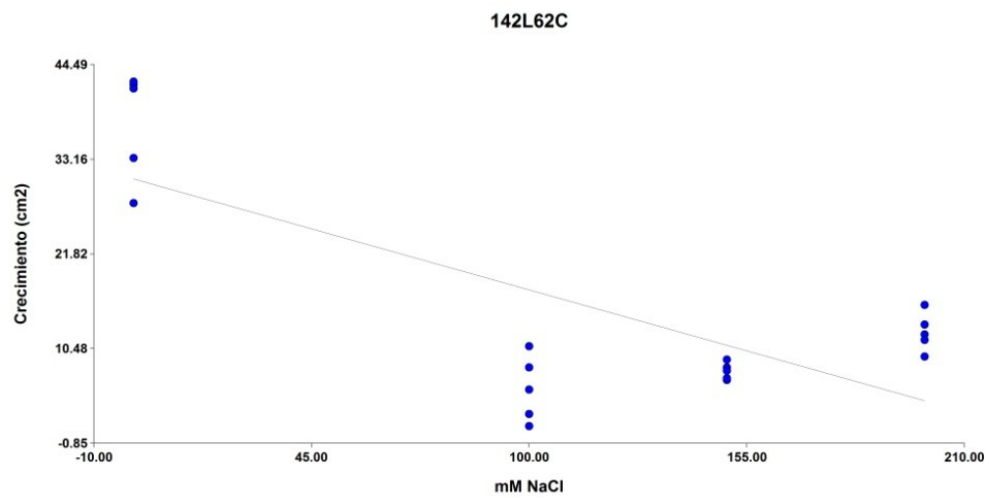


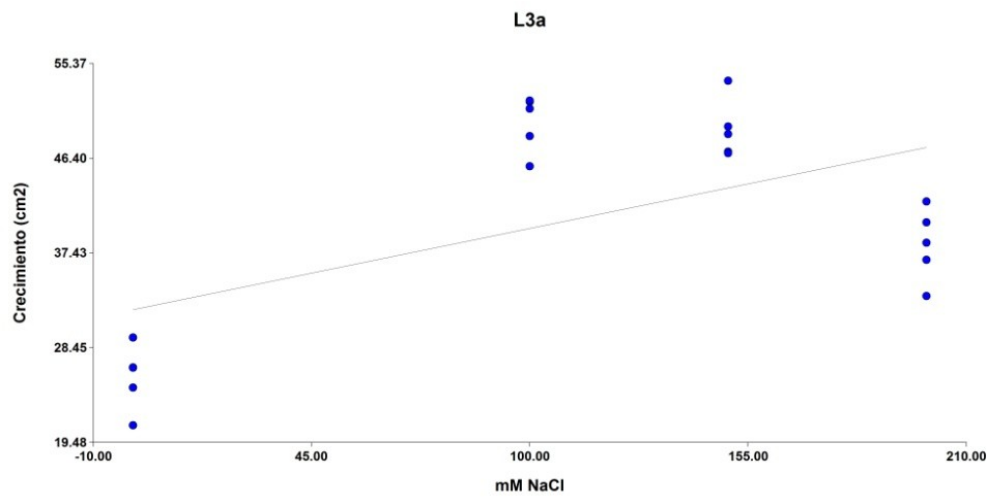
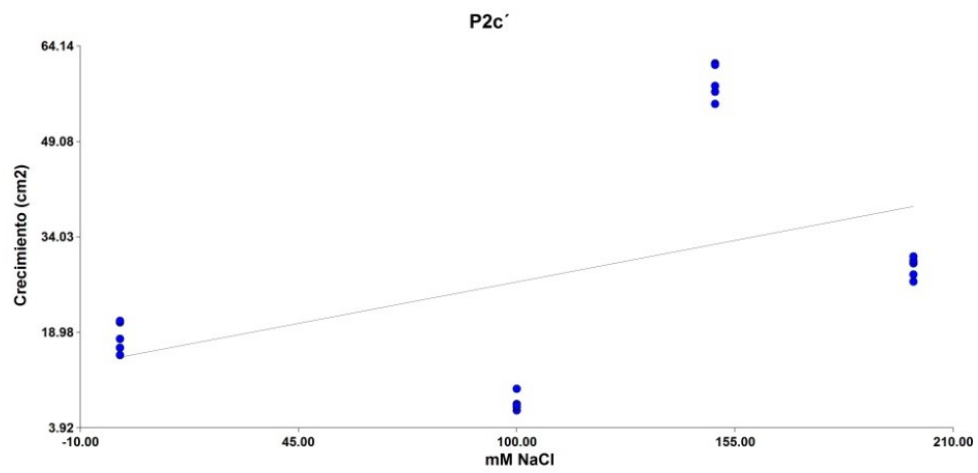
Tabla N° 3.2. Regresión lineal del crecimiento sobre el las concentraciones de salinidad, para los 21 aislamientos evaluados en medio APD, conteniendo 0, 100, 150 y 200 mM de NaCl, luego de un periodo de incubación de 7 días. Aislamientos obtenidos a partir de raíces de *L. tenuis* (L), *Atriplex* sp. (A), *Distichlis* sp. (D) y *Portulaca* sp. (P).

Cepa	R ²	p-value
P1b'	0.65	<0.0001
142L21A	0.33	0.0085
142L62C	0.55	0.0002
A3c	0.35	0.0058
L1cII	0.23	0.0383
L3a	0.31	0.0106
P1c	0.35	0.0151
P2c'	0.21	0.04
142L62	0.19	0.0521
L4a'	0.15	0.0882
D2b'	0.14	0.1043
142L52B	0.18	0.1407
142L67B	0.20	0.1738
142L52A	0.10	0.2859
D1a	0.06	0.3061
D4b	0.06	0.3605
A1b	0.05	0.4407
P1c''	0.03	0.4879
D1c	0.03	0.8768
D2a	1.4E-03	0.8768
A3c'	5.50E-07	0.9975

Figura N° 3.5. Regresiones lineales del crecimiento sobre la concentración de sal, estadísticamente significativas ($p < 0.0001$), para las 21 cepas evaluadas en medio APD suplementado con 0, 100, 150 y 200 mM de NaCl, luego de un periodo de incubación de 7 días. Cepas fúngicas aisladas a partir de raíces de *L. tenuis*, *Atriplex* sp., *Distichlis* sp. y *Portulaca* sp.



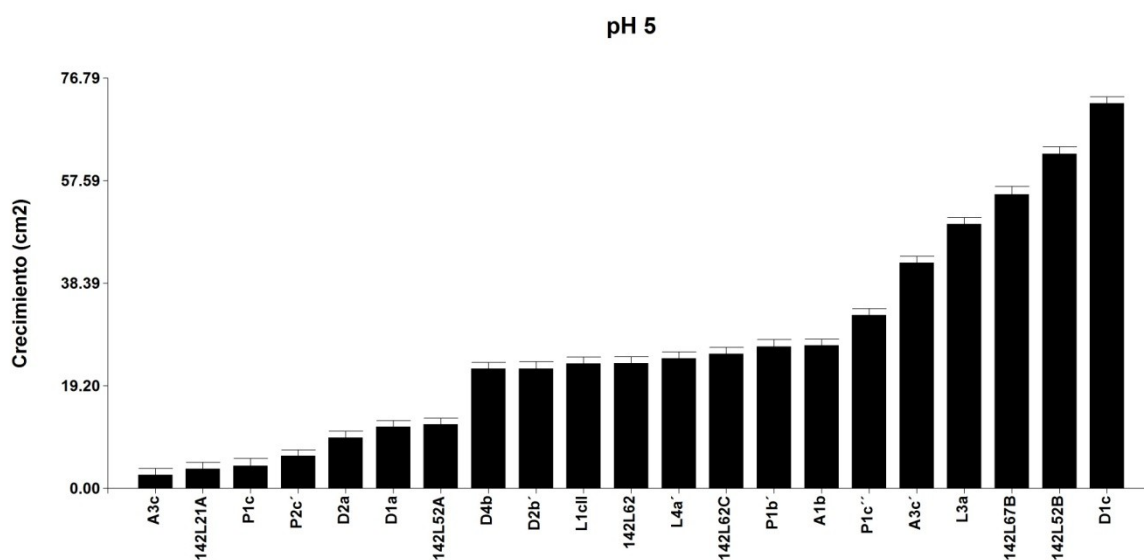


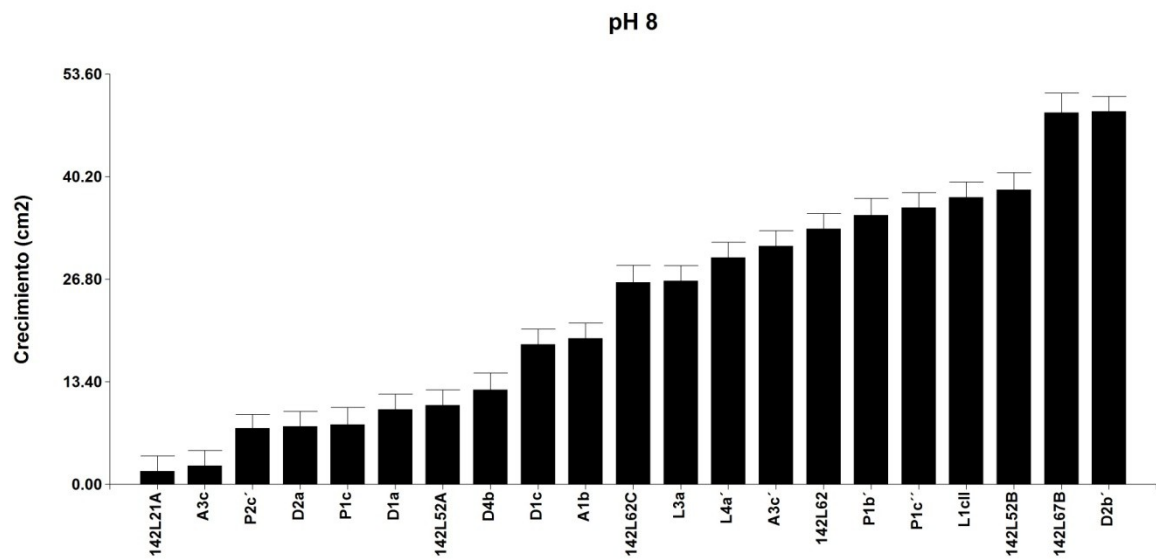
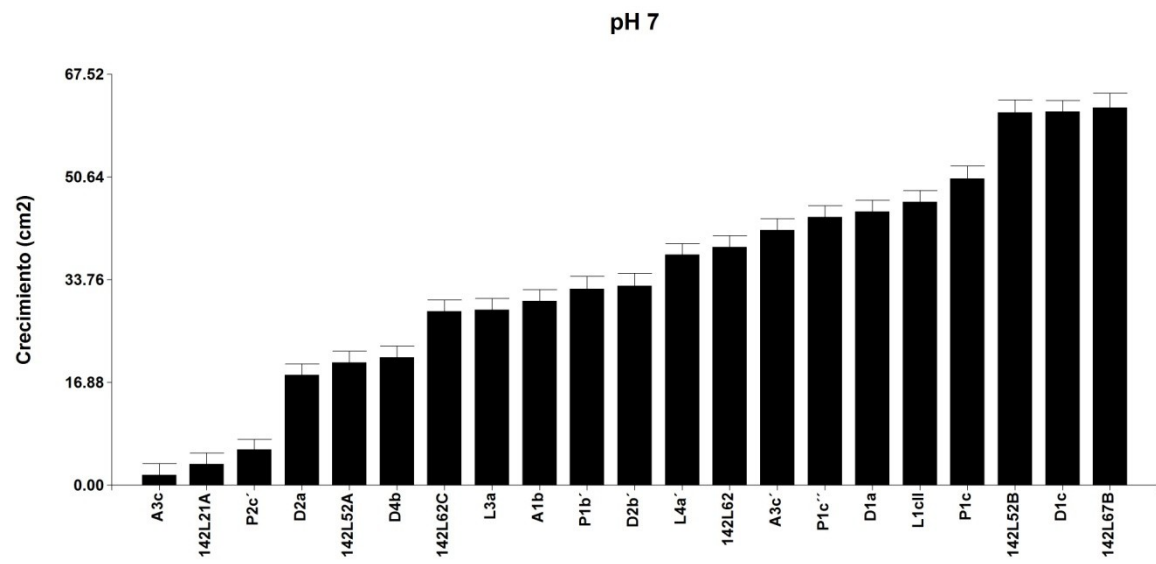
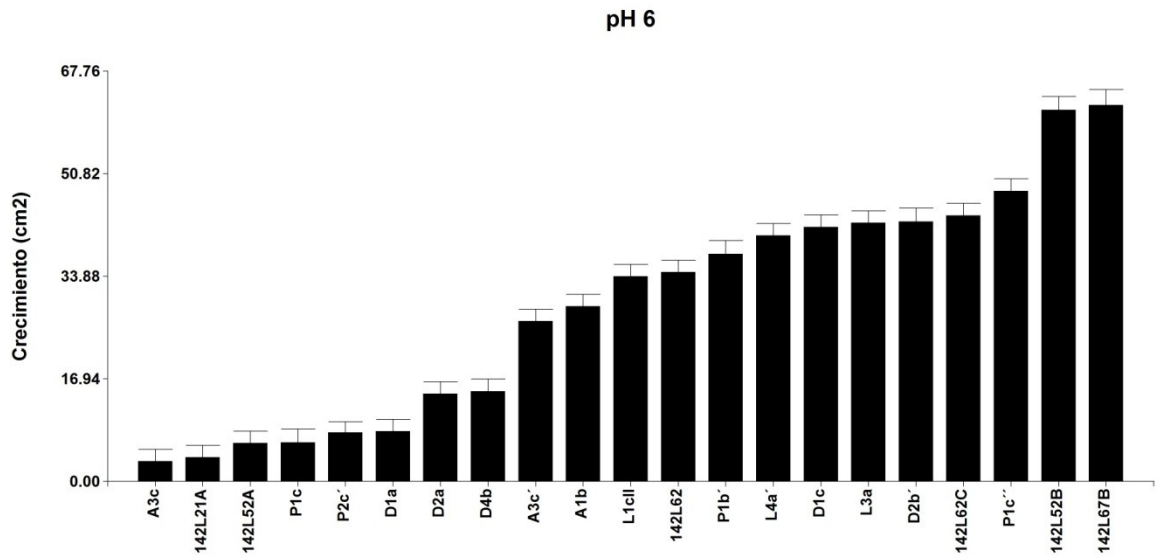


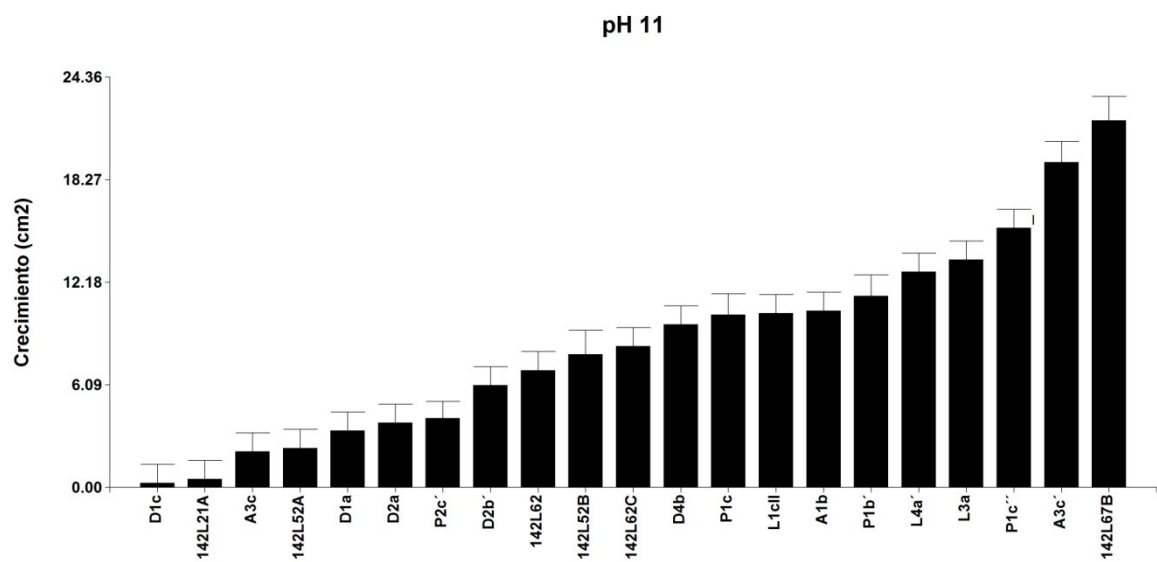
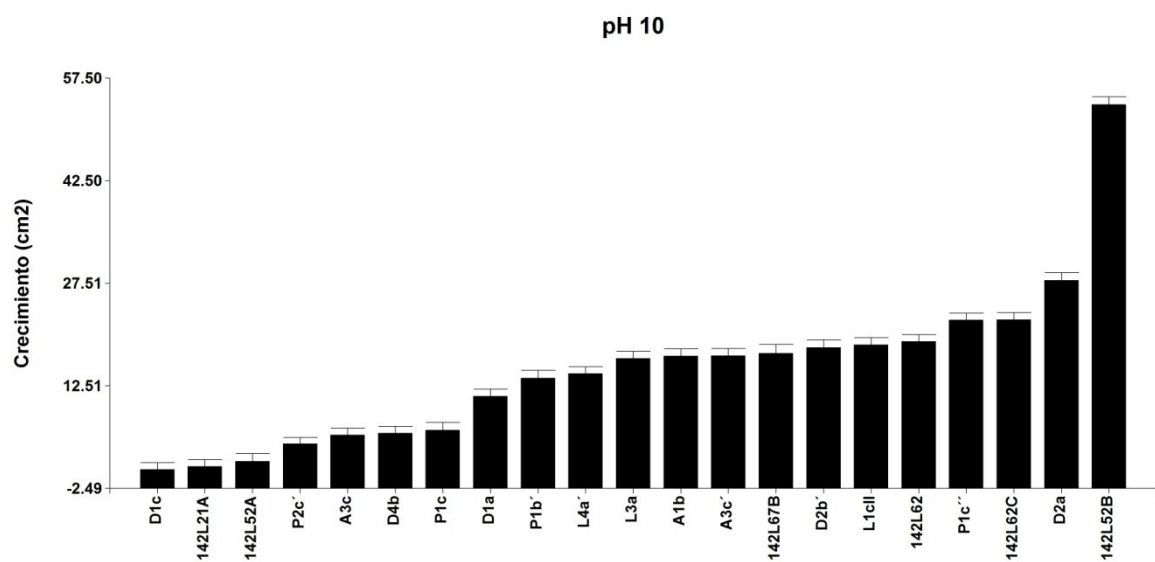
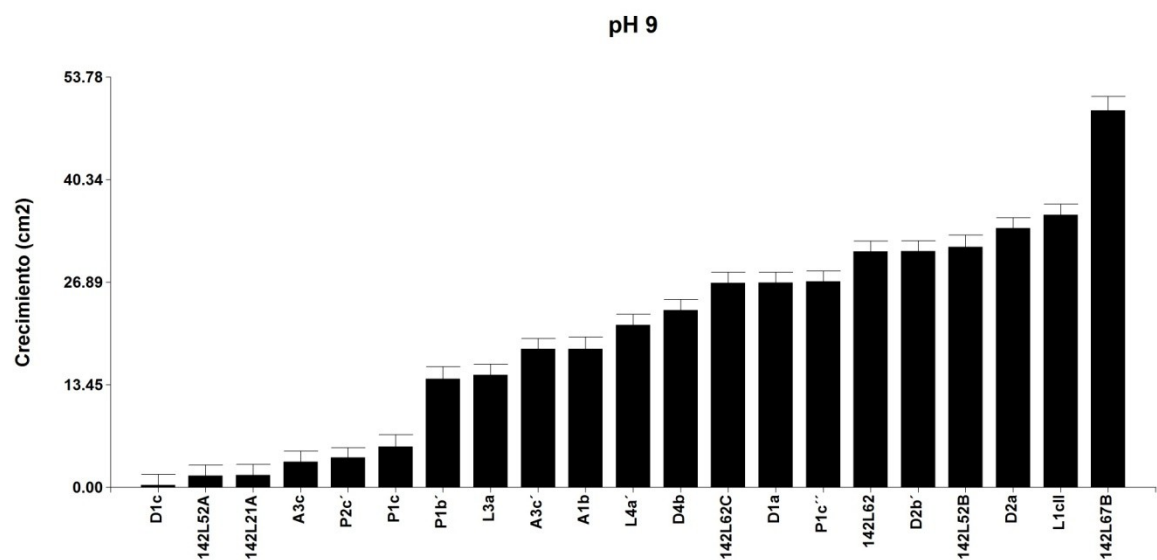
Crecimiento de los aislamientos a diferentes pH

En base al estudio de la capacidad de crecimiento en un amplio rango de pH, se encontró que los aislamientos fueron capaces de crecer en los diferentes pH evaluados en mayor o menor medida, aunque se registró una variación muy importante entre ellas en el grado de crecimiento (Figura N° 3.6). Mientras la cepa identificada como 142L67B alcanzó el mayor crecimiento en el rango de pH 6-9 y a pH 11, aquella identificada como D1c presentó la máxima sensibilidad a la alcalinidad (rango 9-11), siendo su crecimiento prácticamente nulo. Cabe destacar, que esta última cepa fue la que más creció al valor de pH más ácido.

Figura N° 3.6. Crecimiento en diámetro (cm²) de los 21 aislamientos obtenidos a partir de raíces de *L. tenuis*, *Atriplex* spp., *Distichlis* spp. y *Portulaca* spp., en medio AMP a pH 5,6,7,8,9,10 y 11.







Las regresiones lineales del crecimiento sobre el pH mostraron que 17 de los 21 aislamientos fueron significativamente afectados por el aumento del pH (Tabla N° 3.3), presentando todas pendientes de regresión negativas (Figuras N° 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10). Entre los más afectados se encuentran L3a, 142L21A y D1c (Tabla N° 3.3 y Figuras N° 3.7 y 3.8)

Tabla N° 3.3. Regresión lineal del crecimiento sobre el pH, para las 21 cepas evaluadas en medio AMP, en un rango de pH 5-11, luego de un periodo de incubación de 7 días. Cepas fúngicas aisladas a partir de raíces de *L. tenuis* (L), *Atriplex* sp. (A), *Distichlis* sp. (D) y *Portulaca* sp. (P).

Cepa	R ²	P value
L3a	0.86	0.0001
142L21A	0.81	0.0001
D1c	0.81	0.0001
A1b	0.74	0.0001
142L67B	0.70	0.0001
P1c''	0.61	0.0001
A3c'	5.90E-01	0.0001
142L52B	0.57	0.0001
L4a'	0.52	0.0001
P1b'	0.46	0.0001
142L62C	0.44	0.0001
142L52A	0.37	0.0001
142L62	0.36	0.0001
D4b	0.35	0.0002
D2b'	0.29	0.0018
L1cII	0.23	0.0036
P2c'	0.15	0.0237
A3c	0.07	0.1181
D1a	0.04	0.2657
D2a	2.00E-02	0.3971
P1c	0.02	0.5152

Figura N° 3.7. Regresiones lineales múltiples del crecimiento sobre el pH, estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) para los aislamientos obtenidos de *L. tenuis*.

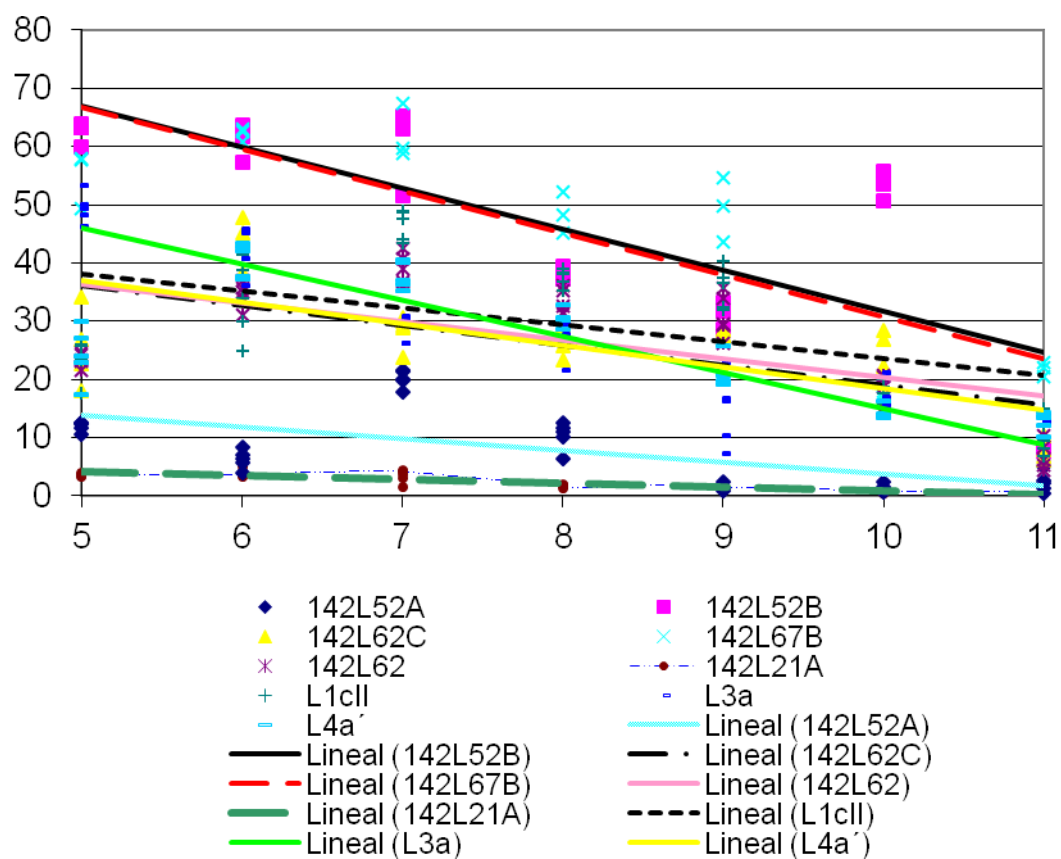


Figura N° 3.8. Regresiones lineales múltiples del crecimiento sobre el pH, estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) para los aislamientos obtenidos de *Distichlis spp.*

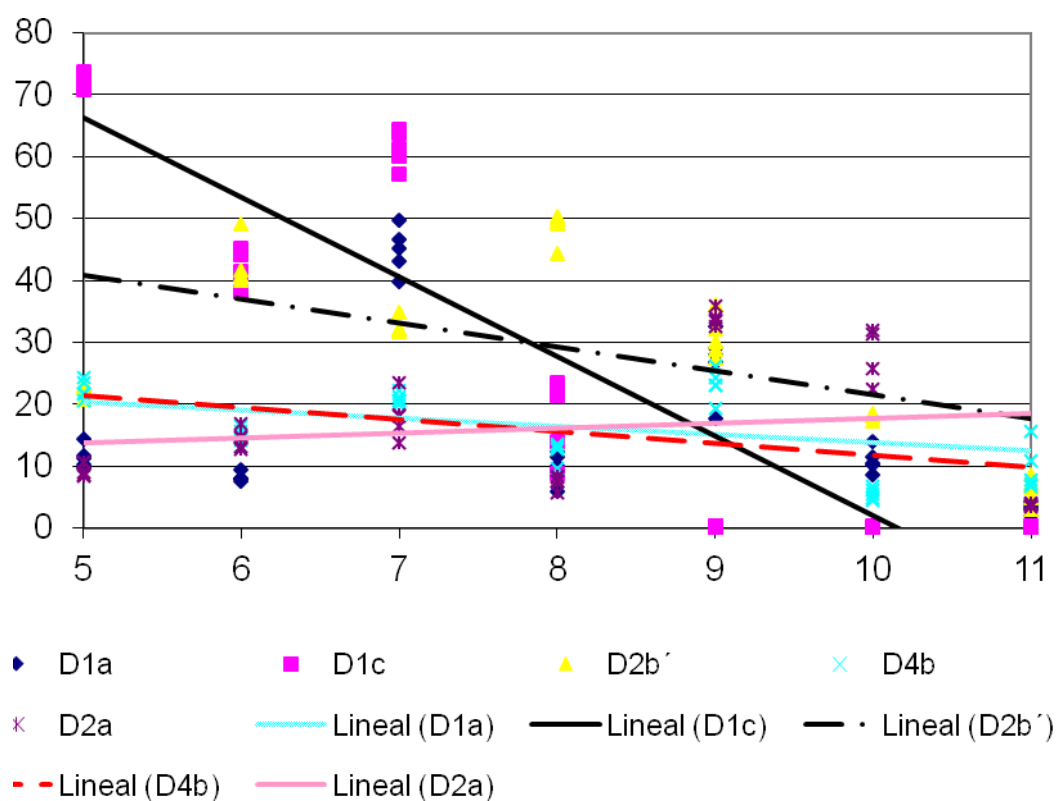


Figura N° 3.9. Regresiones lineales múltiples del crecimiento sobre el pH, estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) para los aislamientos obtenidos de *Portulaca spp.*

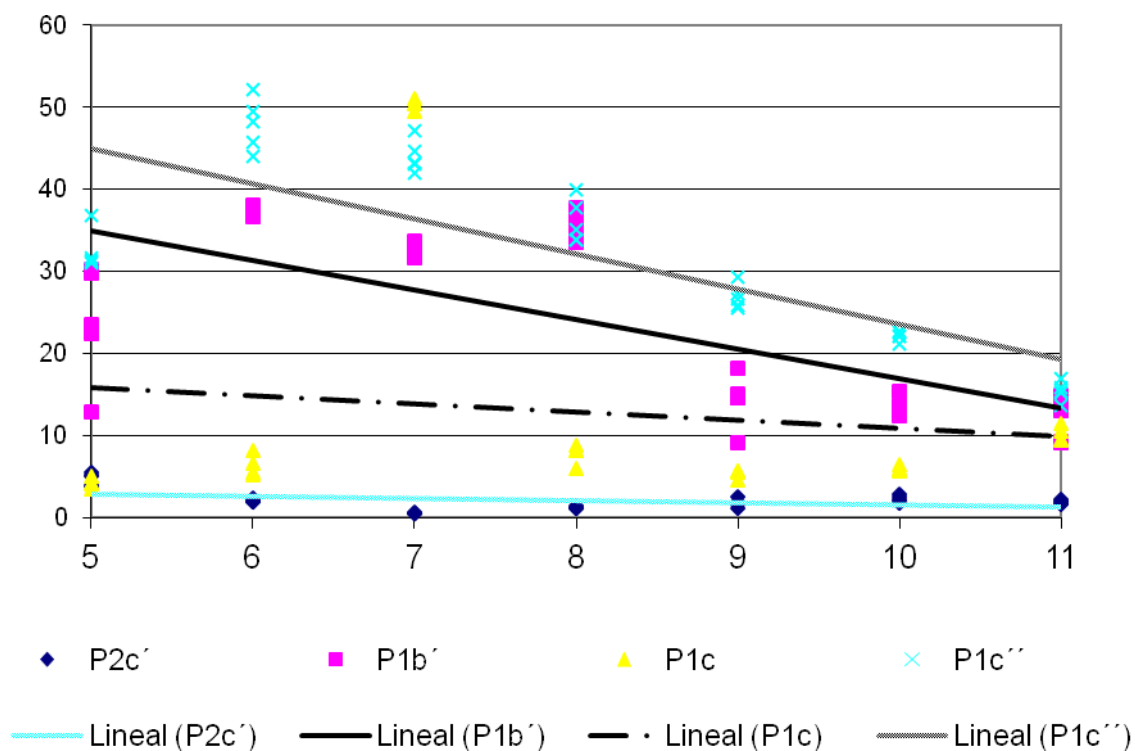
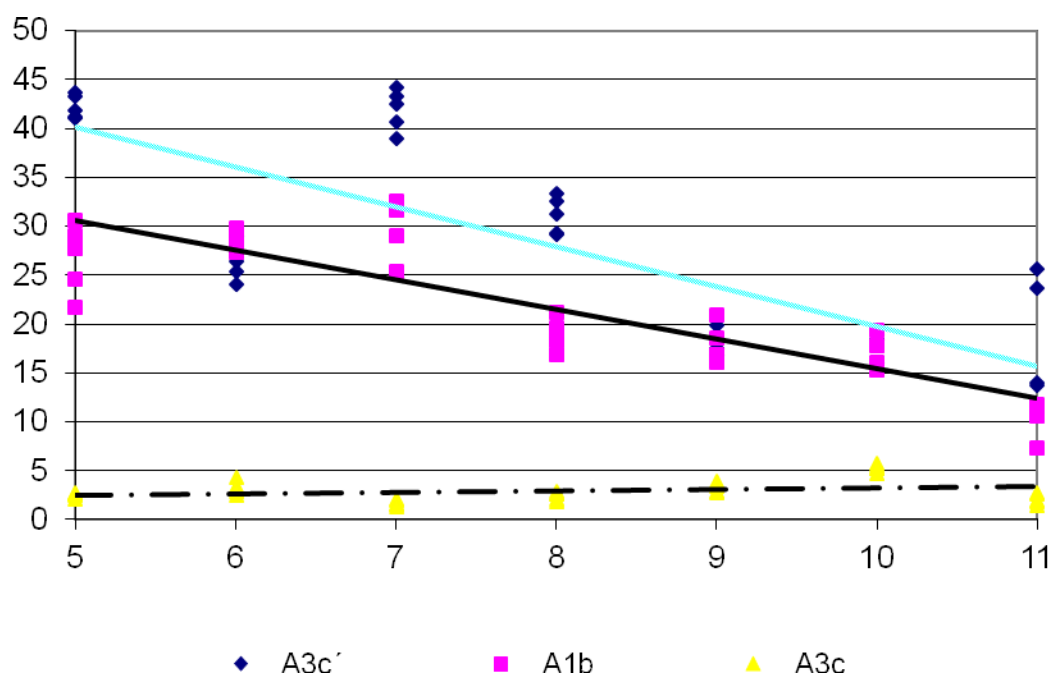
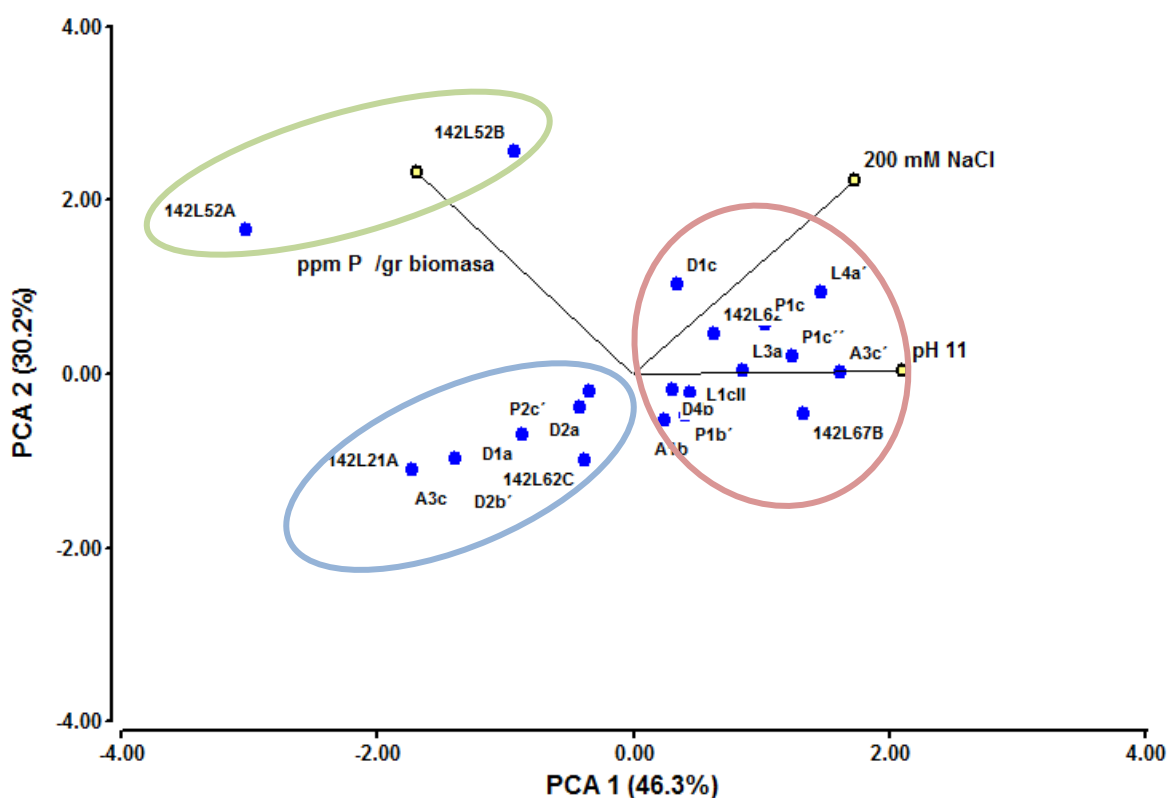


Figura N° 3.10. Regresiones lineales múltiples del crecimiento sobre el pH, estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) para los aislamientos obtenidos de *Atriplex sp.*



Los componentes 1 y 2 del PCA explicaron el 76.5% de la variabilidad entre las cepas aisladas. Este análisis permitió distinguir a tres grupos de aislamientos, de acuerdo a su capacidad para crecer en las condiciones más extremas ensayadas (200 mM y pH=11), así como también de acuerdo a su capacidad para solubilizar fosfatos (Figura N° 3.11). Los aislamientos identificadas como 142L52A y 142L52B se agruparon por este último atributo, mientras que el resto de los aislamientos se distribuyeron entre un grupo que mejor creció a elevados valores de pH y de salinidad (entre los que se encuentra D1c y 142L67B) y otro que menos creció en presencia de esas mismas condiciones experimentales, dentro del que están incluidas las identificadas como 142L21A y las restantes cepas procedentes de *Distichlis*.

Figura N° 3.11. Análisis de componentes principales de los 21 aislamientos obtenidos a partir de raíces de *L. tenuis*, *Atriplex spp.*, *Distichlis spp.* y *Portulaca spp.*, según su capacidad para crecer a 200 mM NaCl, a pH=11, y para solubilizar fosfato.



El análisis de discriminantes (Figura N° 3.12) permitió detectar que el hospedante ejerce influencia sobre el crecimiento de los aislamientos evaluados, aunque con algún grado de error, indicando el posible solapamiento de los grupos *Distichlis*, *Lotus* y *Portulacca* (Tabla N° 3.4). Los ejes canónicos 1 y 2 acumularon el 93, 8 % de la variabilidad. Los aislamientos procedentes de *Portulacca* y *Atriplex* se distinguieron de aquellos aislados de los otros dos hospedantes, por un mayor crecimiento a los niveles más elevados de pH y a niveles intermedios de salinidad, mostrando que los aislamientos obtenidos a partir de *Atriplex*, poseen una menor capacidad para solubilizar fósforo que las aisladas de *Portulacca*. Por otro lado, los aislamientos obtenidos de *Distichlis* se asociaron a un mayor crecimiento a la máxima concentración de sal ensayada (200 mM) y pH ácido (5), o de alcalinidad intermedia (pH 8-9), con baja aptitud para la solubilización de fosfatos.

Finalmente, los aislamientos procedentes de *L. tenuis* se diferenciaron del resto por su mayor capacidad para solubilizar fosfatos y para crecer en una concentración salina muy elevada (200 mM) y un rango amplio de pH.

Figura N° 3.12. Análisis de discriminantes de los 21 aislamientos obtenidos a partir de raíces de *L. tenuis*, *Atriplex spp.*, *Distichlis spp.* y *Portulacca spp.*, según su capacidad para crecer a concentraciones crecientes de NaCl y pH y para solubilizar fosfato.

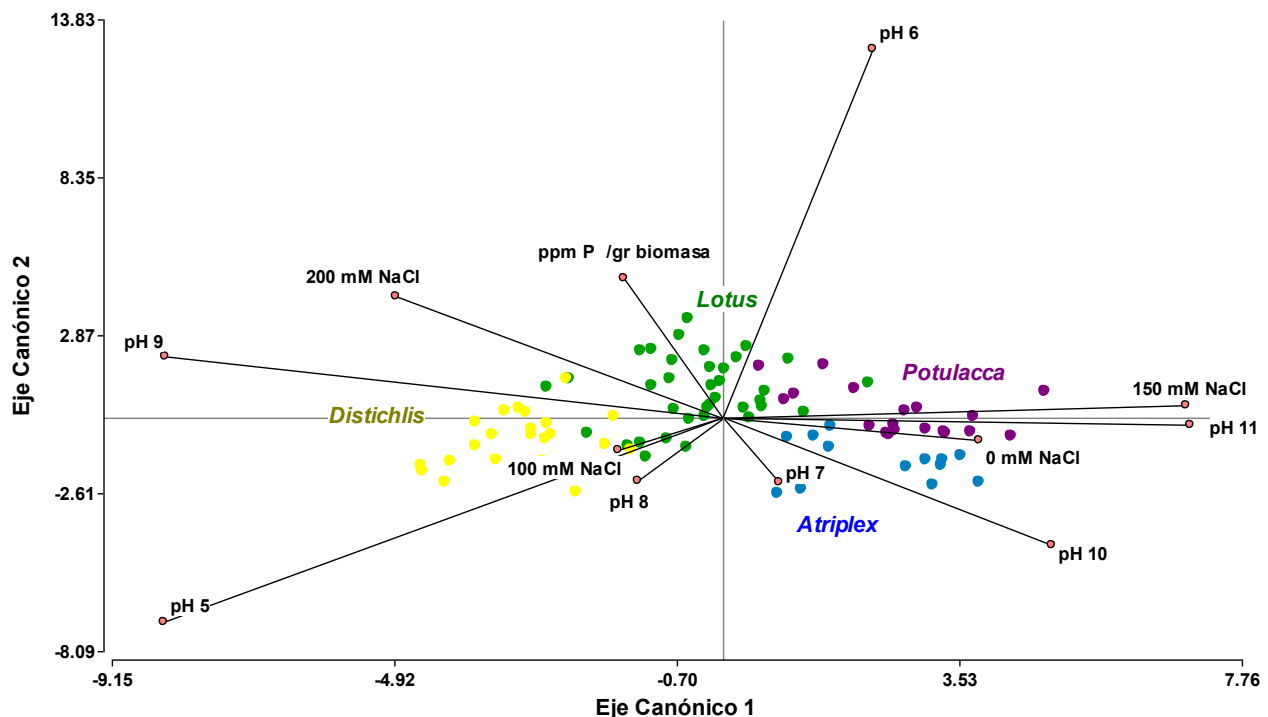


Tabla N° 3.4. Clasificación cruzada (tasa de error aparente), resultante del análisis discriminante realizado sobre la clasificación de las 21 cepas agrupadas según *L. tenuis*, *Atriplex* spp., *Distichlis* spp. y *Portulaca* spp.

Grupo	<i>Atriplex</i>	<i>Distichlis</i>	<i>Lotus</i>	<i>Portulacca</i>	Total	Error (%)
<i>Atriplex</i>	13	0	0	0	13	0.00
<i>Distichlis</i>	0	20	2	0	22	9.09
<i>Lotus</i>	4	5	26	1	36	27.78
<i>Portulacca</i>	1	0	4	14	19	26.32
Total	18	25	32	15	90	18.89

Selección de cepas e identificación taxonómica

Los aislamientos identificados como 142L52A y 142L52B, ambos aislados de *L. tenuis*, fueron seleccionados para estudios posteriores por presentar los niveles más altos de solubilización de P *in-vitro*, además de tolerar alcalinidad y salinidad por NaCl. Estas cepas fueron identificadas molecularmente como organismos del género *Fusarium* en base a la secuencia ITS y la base de datos *UNITE*. Debido a que el análisis de las secuencias ITS no permitió la identificación a nivel de especie, se procedió a amplificar y analizar la región TEF, lo cual llevó a confirmar el género y a identificar las cepas como pertenecientes a las especies *F. solani* (142L52B) y *F. oxysporum* (142L52A).

Discusión

La bibliografía disponible hasta ahora, cuenta con varios estudios que investigan la capacidad de los microorganismos para solubilizar P en diferentes medios de cultivo y con fuentes de P variadas (Pikovskaya 1948, Gupta y col. 1994, Nautiyal 1999). En este estudio, las cepas con mayor capacidad para solubilizar P pertenecieron a las especies *F. oxysporum* y *F. solani* (142L52A y 142L52B). Este resultado no es inesperado, dado que las cepas de *Fusarium* se han reportado (junto con las de *Aspergillus* y *Penicillium*) entre las más poderosas solubilizadoras de fosfatos (Behera y col., 2014; Castro y col., 2007; Matias y col., 2009). Ambas cepas podrían ser candidatas a formar parte de formulaciones biológicas destinadas a incrementar la disponibilidad de P en cultivos de *L. tenuis* (hospedante asintomático del que fueron aisladas). Es importante destacar que aunque el género *Fusarium* es reconocido por la patogenicidad de varias de sus especies y un rango de hospedantes amplio, también constituye un hecho reconocido la especificidad de las mismas para determinadas especies de hospedantes (Lievens y col., 2008), por lo que es poco probable que los patotipos de *F. oxysporum* o *F. solani* representen una amenaza patógena para las prácticas de promoción del *L. tenuis*. No obstante, sería importante evaluar su rango de hospedantes, el efecto fisiológico sobre las plantas de interés que puedan compartir el nicho ecológico-productivo con esta leguminosa y los posibles mecanismos y factores de interacción intervinientes en el desarrollo de potenciales patosistemas.

Por otra parte, se ha reportado que la mayoría de los endofitos fúngicos, incluyendo *F. oxysporum*, tienen capacidad para producir diferentes tipos de hormonas tales como el AIA y giberelinas (Hassan, 2002), pero sería importante determinar si también mejorarían la nutrición fosforada de la planta, mediando en la absorción de P, como ocurre con las micorrizas arbusculares.

En el presente relevamiento, se ha empleado Ca_3PO_4 para las evaluaciones de solubilización. Sin embargo, el empleo de fuentes alternativas de P, tales como Al_3PO_4 y Fe_3PO_4 , así como también varias fuentes de P orgánicas, contribuirían a un mejor entendimiento de los mecanismos de solubilización que emplean los hongos endofitos aislados y también a la mejor selección de cepas con alta performance en suelos con diversas fuentes de P (Bashan y col. 2013). A partir de los aislamientos realizados en este trabajo de tesis, quedarían pendientes estudios más detallados y la identificación precisa

de los 19 aislamientos restantes, las cuales, vale tener presente, han presentado una baja capacidad para solubilizar fosfato en las condiciones experimentales utilizadas.

También es importante tener presente que la acidificación del medio constituye uno de los procesos que llevan a la solubilización de fosfatos (Bashan y col. 2013). En el presente estudio, se evaluó el pH del medio NBRIP al final del experimento y se calculó la diferencia entre pH final y pH inicial del medio sobrenadante (resultados no mostrados). Se observó que todas las cepas fueron capaces de reducir el pH del medio, pero un análisis de correlación lineal de *Pearson* entre la capacidad solubilizadora de pH y el descenso del pH del medio de cultivo como consecuencia del crecimiento fúngico resultó no significativa, sugiriendo la intervención de algún otro mecanismo, como puede ser la producción y liberación al medio de enzimas fosfatasas. En 2015, Radhakrishnan y colaboradores reportaron el incremento de las actividades fosfatasa ácida y alcalina de la cepa endofítica *F. verticillioides* RL01, conjuntamente con un aumento de la biomasa fúngica y la disminución de los niveles de Ca_3PO_4 en el medio de cultivo.

Estudios comparativos entre cepas de diversas posiciones taxonómicas demostraron que los hongos *Deuteromycetes* (con filiación a *Ascomycetes*) y en particular las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, se encuentran entre los más tolerantes a elevadas concentraciones de sal, en tanto los *Basidiomycetes* por lo general incluyen las cepas más sensibles a la misma condición (Tresner y Hayes, 1971; Butinar y col., 2011).

Por otra parte, las especies de hongos imperfectos que pueden habitar endofíticamente las raíces de las plantas son numerosas. Entre ellas se encuentran incluso algunas especies como *Penicillium* con cepas de comprobada actividad mutualista bajo condiciones de elevada salinidad en el sustrato (Leitãoa y Enguita 2016; Kahn y col., 2001); *F. solani* aislado de *Suaeda japonica* (You y col., 2012) o *Aspergillus tubingensis* YH103 (You y col., 2016) aislado como endofito de *Tetragonia tetragonoides*. Es importante recordar que todas las especies vegetales mencionadas se caracterizan por habitar ambientes salinos.

Si bien, existe un buen número de trabajos que demuestran la tolerancia a la salinidad por parte de diversos grupos fúngicos (Jogawat y col., 2016; Qin y col., 2017), la información existente acerca de la propiedad de organismos fúngicos de tolerar niveles elevados de salinidad es escasa y en la mayoría de los casos está vinculada de forma directa con el

efecto de la salinidad sobre los cultivos y el beneficio indirecto de ciertas inoculaciones con microorganismos. Más escasos aún, son los estudios que demuestran el “comportamiento halofítico” de cepas fúngicas. Entre estos vale la pena mencionar el trabajo de Obuekwe y colaboradores (2005), quienes examinaron los efectos del NaCl en la producción de biomasa de varias especies fúngicas, en un medio que contenía petróleo crudo como única fuente de carbono y energía, demostrando que la adición de NaCl (10%) mejoraba 4 veces el desarrollo de biomasa en *F. lateritium* y *Drechslera sp.* respecto del control sin sal.

Por otra parte, la capacidad de los hongos para crecer en ambientes alcalinos ha sido evaluada por diversos autores (Di Menna, 1959; Goto y col., 1981; Aono, 1990; Steiman y col., 2004). Los resultados de este trabajo de tesis demostraron que, si bien la mayoría de las cepas toleraron altos niveles de pH, todas ellas fueron negativamente afectadas en su producción de biomasa acorde se aumentó la alcalinidad. Este resultado está en línea con el concepto generalizado de que los organismos fúngicos tienen preferencia por el pH ácido. De acuerdo a la clasificación de Nagai (1995), todos los aislamientos estudiados en este trabajo de tesis pueden incluirse en el grupo de los álcali-tolerantes excepto “D1c”, que prácticamente no logró crecer a valores de pH 9, 10 y 11. Sin embargo esta cepa fue aislada de *Distichlis sp.*, un género vegetal de reconocida habilidad para crecer en suelos alcalinos y salino-alcalinos (Prodger y Inskeep, 1991).

Maciá-Vicente y colaboradores (2012) especularon que el carácter sensible a la salinidad de algunos endofitos fúngicos aislados de plantas que crecen naturalmente en suelos restrictivos, obedece a que las raíces ofrecen “un ambiente protegido” a dichas restricciones. Esta especulación podría hacerse extensiva, a la sensibilidad frente a la alcalinidad. Al respecto, es interesante el resultado del análisis discriminante, el cual dejó en evidencia que las cepas se separan en grupos bien definidos, a lo largo del eje canónico 1, cuya función se encuentra determinada por los niveles de pH y de salinidad. Este resultado sugiere que la especie hospedante podría influir sobre el nivel observado de tolerancia de las cepas que se encuentran dentro de sus raíces. Probablemente la raíces de las especies hospedantes estudiadas presenten diferentes mecanismos de homeostasis respecto de la acumulación de iones tóxicos como el Na^+ y el Cl^- , y respecto del pH del apoplasto (ambiente donde se localizarían las hifas de los endofitos), de modo que cada una de ellas actuaría como un medio de selección en el que las cepas se “acomodan” dentro de ellas, según su nivel de tolerancia a las mismas. Esta hipótesis

encuentra cierto sustento en un trabajo de Goldmann y colaboradores (2016) quienes propusieron que las raíces tienen un impacto selectivo sobre la comunidad de hongos asociada y que ofrecen un efecto tampón frente a las variables microclimáticas y ambientales que influyen directamente sobre la composición fúngica.

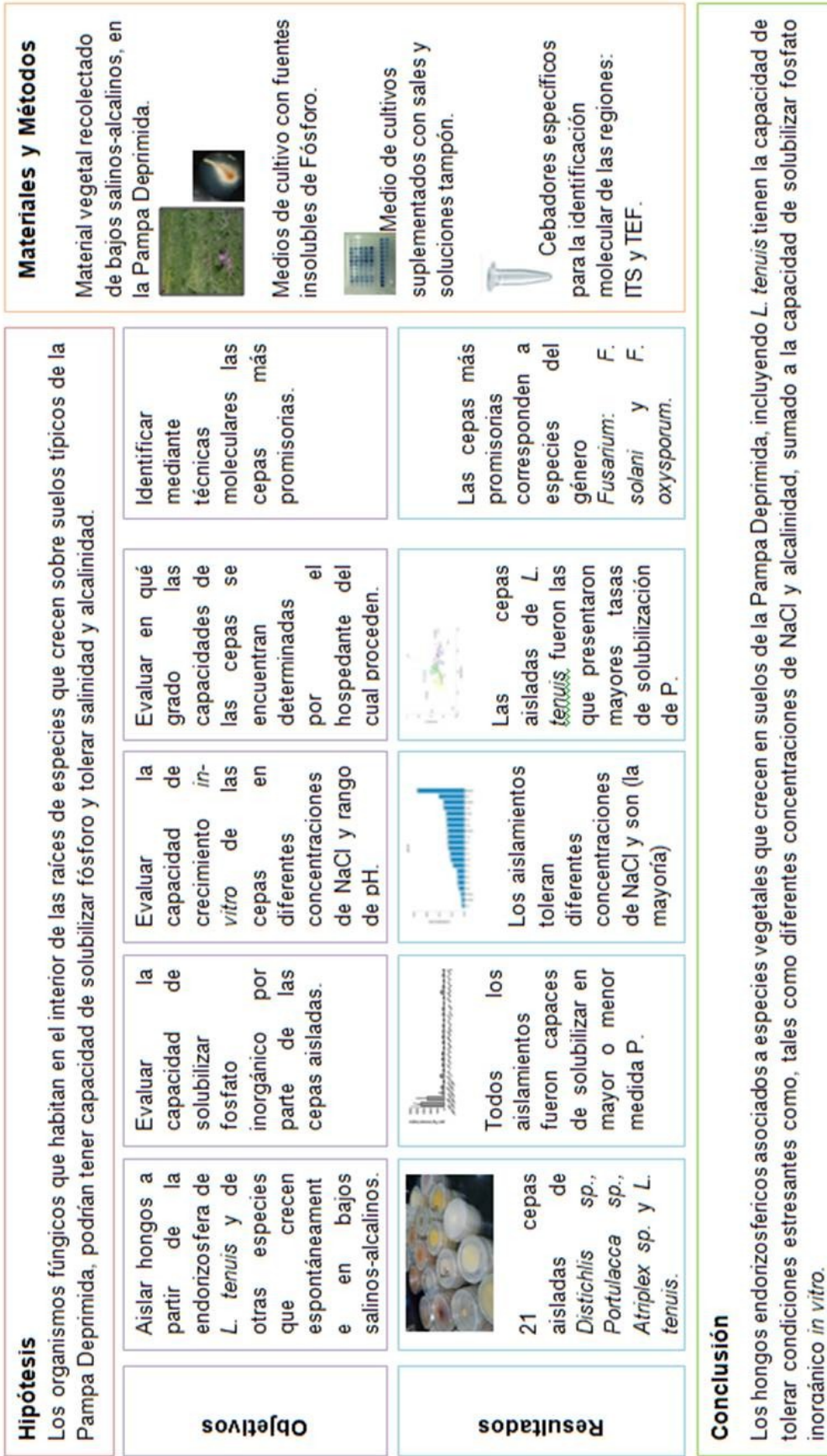
Conclusión

En el presente capítulo se evidenció la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico por parte de hongos que habitan en la endorizosfera de la flora que crece espontáneamente en los ambientes de la Pampa Deprimida con presencia naturalizada de *L. tenuis*. Adicionalmente, se demostró que estos organismos, presentan la habilidad de crecer *in-vitro* en condiciones estresantes, similares a las encontradas en el ambiente edáfico en el cual habitan naturalmente.

Es esperable que los microorganismos y los organismos vegetales que habitan en ambientes restrictivos tengan la capacidad de tolerar condiciones estresantes como resultado de la selección y evolución. Por otra parte, también podría suponerse que el motivo por el cual *L. tenuis* se ha naturalizado con éxito en la Pampa Deprimida, podría estar fundamentado no sólo por la capacidad intrínseca que posee para tolerar condiciones abióticas estresantes, sino también por la acción conjunta de los microorganismos que habitan el ecosistema y los cuales podrían desencadenar mecanismos beneficiosos para un mayor crecimiento y una mejor implantación y persistencia de la leguminosa.

Por otra parte, los hongos endofitos con capacidad de solubilizar fosfato inorgánico podrían aportar una proporción de los requerimientos nutricionales fosforados para las especies vegetales que crecen en estos suelos, donde quizás otros organismos con la misma función no puedan realizarlo debido a las limitaciones encontradas en el ambiente edáfico, tales como la salinidad por NaCl y la alcalinidad. Este mecanismo de mejora en la nutrición vegetal constituye un factor de relevancia en suelos como los que caracterizan los ambientes marginales para la agricultura de la Pampa Deprimida del río Salado.

Diagrama Resumen – Capítulo 3



Capítulo 4

Interacciones entre leguminosas del género *Lotus* y hongos endofitos

La interacción *Lotus spp.-Fusarium solani* como modelo de estudio

Introducción

Interacciones planta-hongos endofitos

Las relaciones entre los seres vivos están definidas por el efecto de la interacción sobre cada una de las especies que la integran (Johnson y col., 1997, Bronstein y col., 1994; Burkholder y col., 1952). El comensalismo ocurre cuando una de las especies se beneficia, mientras que la otra no se ve afectada. Por su parte, el parasitismo es una interacción, en la cual la especie que se beneficia lo hace a expensas de los recursos de la segunda especie, que se ve perjudicada, mientras que el amensalismo ocurre cuando una de las especies es inhibida mientras que la otra no es afectada. Asimismo, podemos definir a la competencia como la interacción donde ocurre un detrimento mutuo entre los participantes, ya que ambos son inhibidos o perjudicados, lo cual puede ser un grado diferente para cada uno de los organismos intervinientes en la interacción. Finalmente, podemos definir a las relaciones mutualistas como aquellas en las que ambas especies se benefician (Figura N° 4.1)

Figura N° 4.1. Tipos de interacciones entre diferentes especies (Modificado de Johnson y col., 1997).

Gradiente de respuesta del huésped	-		Competición (-, -)
	0	Neutralismo (0, 0)	Amensalismo (-, 0)
	+	Mutualismo (+, +)	Parasitismo (-, +)
		+	0
			-
		Gradiente de respuesta del hospedante	

Las interacciones planta-endofitos pueden abarcar diversos tipos de interacciones, que van desde el mutualismo a la patogénesis (Saikkonen y col., 1998, Johnson y col., 1997; Douglas, 2010, Kiers y col., 2010). En algunos casos, una misma interacción puede oscilar a lo largo de un *continuum* entre mutualista y antagónica. (Saikkonen y col., 1998).

La medida de la interacción endofítica es cuantificada a través del *fitness* de la planta hospedante, es decir la medida de la *condición* del hospedante como producto de la infección asintomática (Clay, 1988; Selosse y col., 2007; Rodriguez y col., 2009; Redman y col., 2011). El *fitness* puede ser positivo o negativo, con beneficios o perjuicios al hospedante, siempre desde el punto de vista del organismo vegetal (Müller y col., 2005). El *fitness* puede ser cuantificado a través del índice de supervivencia y de fecundidad, o bien, la acumulación o detrimento de la biomasa puede ser una variable adecuada para ser utilizada como medida del *fitness* (Kiode y Elliot, 1989; Ahlholm y col., 2002). En sistemas experimentales, la biomasa de plantas individuales es aceptada como medida del efecto de la interacción entre el endofito y el hospedante vegetal (Johnson y col., 1997).

Otras aproximaciones metodológicas para evaluar la relación costo/beneficio de la interacción

Debido a que el micelio del endofito constituye una nueva fuente de carbohidratos, N y otros nutrientes de la planta hospedante, los efectos debidos a los requerimientos energéticos del mismo, podrían estar implicados en cambios del crecimiento de las plantas inoculadas (Ahlholm y col., 2002). Partiendo de la hipótesis de que el efecto provocado sobre la planta por la presencia del endofito respondería a múltiples factores tales como la producción de hormonas y enzimas, las cuales a su vez, alterarían el metabolismo primario, la fotosíntesis neta, y la conductancia estomática, se ha propuesto que mediante la medición de la actividad fotosintética es posible establecer el grado de importancia de la afectación por la presencia del endofito sobre el hospedante (Spiering y col., 2006). En base a ello, el grado de afectación provocado en una interacción dada, puede ser evaluado monitoreando *in-vivo* la fluorescencia de la clorofila del hospedante (Berger y col., 2007). El método consiste en la medida de la fluorescencia de la clorofila “a” en una hoja previamente acondicionada a la oscuridad, mediante pulsos de luz saturantes (Schreiber y col., 2004). La fluorescencia constituye un marcador muy sensible para evaluar la eficiencia fotosintética desde el momento en que la energía es absorbida y

utilizada en el proceso de la fotosíntesis, discerniendo ésta de aquella que resulta disipada en forma de calor o radiación emitida (van Kooten y Snel, 1990).

La aplicación de cromatografía gaseosa, del inglés *Gas Chromatography* (GC) y espectrometría de masas, del inglés *Mass Spectrometry* (MS), es la plataforma tecnológica ampliamente utilizada para el estudio de metabolitos. La plataforma GC-MS, acoplada a un detector de ionización de impacto, del inglés *Electric Impact Ionization* (EI) en muestras complejas es una herramienta ampliamente utilizada (Fiehn y col, 2000). Esta técnica fue mejorada a través de los años con la incorporación de detectores de Tiempo de vuelo, del inglés *Time of flight* (TOF) para mejorar la sensibilidad en la detección de los metabolitos analizados y obtener una mejor cantidad y calidad de datos (Allwood y col., 2009). Gracias al perfeccionamiento de la tecnología de detección, sumado a nuevos métodos para el procesamiento de los datos obtenidos, el campo de la metabolómica ha avanzado rápidamente en los últimos años, convirtiéndose en una herramienta que puede brindar información de cientos ó miles de metabolitos en una sola muestra, es decir un análisis cuantitativo y cualitativo del perfil metabólico de la muestra (Tenenboim y Brotman, 2016). La información del perfil metabólico, combinado con herramientas estadísticas, permite detectar los cambios integrales en el sistema analizado frente al estrés abiótico (Broeckling y col., 2004; Lisec y col., 2006).

Organismos del género *Fusarium* como endofitos

Diversos autores han sugerido que endofitos del género *Fusarium* mantienen con las raíces, interacciones positivas similares a la del género *Neotyphodium* (*Epichlöe*) y las gramíneas de los géneros *Lolium* y *Festuca*, sobre las cuales existen numerosos reportes (Hallmann y Sikora, 1994). Sin embargo, también existen notorias diferencias entre las mismas, siendo quizás la principal, el hecho de que la transmisión de los endofitos del género *Fusarium* es horizontal y no vertical como el caso de los endofitos del género *Neotyphodium* (Adams, 1921).

Las diferentes especies del género *Fusarium* están distribuidas en un amplio rango geográfico, condiciones climáticas, hábitats y plantas hospedantes (Backhouse y col., 2001). Si bien algunas especies de este género son patógenos radiculares reconocidos en cultivos (Booth, 1971), las infecciones por *Fusarium spp.*, también pueden ser asintomáticas (Bacon y Hinton, 1996; Schulz y col., 2006). Se ha descrito que ciertas especies de *Fusarium* pueden infectar tejidos vivos comportándose como biotrofos (Corell

y col., 1992; Munkvold y Carlton, 1997; Carter y col., 2000; Mesterhaszy y col., 2003), pero que luego de un período de latencia, permanecen en el interior de la planta hospedante sin causar daños aparentes (Schulz y col., 2006).

Ejemplos de especies del género *Fusarium* con capacidad de infectar plantas de manera asintomáticas son: *F. graminearum* (Gordon, 1952), *F. oxysporum f sp. melonis* (Katan, 1971), *F. oxysporum* (Lemanceau y col., 1993), *F. nivale*, *F. culmorum* (Sieber y col., 1988), *F. crookwellense* (Boshoff y col., 1996), *F. culmorum* (Kang y Buchenauer, 1999). La especie *F. solani* fue reportada como endofito de *Camptotheca acuminata* (Kusari y col., 2011), *Lycopersicon esculentum* (Kavroulakis y col., 2007; Imazaki y col., 2015), *Taxus baccata* (Tayung y col., 2011), *Apodytes dimitata* (Shweta y col., 2010). Además de producir infecciones asintomáticas, también existe evidencia de que estas especies fúngicas pueden mejorar el *fitness* de la planta, como consecuencia de la interacción. Un ejemplo es aquella establecida entre *Zea mays* y *F. graminearum* (Bacon y col., 1996) la cual es asintomática y conlleva una promoción del crecimiento (Yates y col., 1997, Haapalainen y col., 2016).

Evaluación de la interacción *Fusarium spp*-*Lotus spp*.

Otra especie de *Lotus*, *L japonicus*, ha sido adoptada por la comunidad científica como especie modelo para la investigación de leguminosas. Esta especie ofrece todas las propiedades mostradas por otros modelos clásicos, como su tamaño del genoma pequeño, auto-fertilidad y un ciclo de vida corto, con la adición de algunas diferencias biológicas con otras legumbres modelo (*Medicago spp.* o *Trifolium spp.*) que lo que lo hacen, en cierta medida, un representante único entre este grupo (Udvardi y col., 2005; Sato y Tabata, 2006; Bordenave y col., 2013). En los últimos años se desarrollaron muchos recursos genéticos en *L. japonicus* y han jugado un papel determinante en el progreso logrado en la investigación de leguminosas, particularmente en temas como el desarrollo de la simbiosis y la aclimatización del estrés a largo plazo (Perry y col., 2003; Gondo y col., 2007). La puesta a punto de un sistema experimental simbiótico entre una planta modelo como *L. japonicus* y endofitos de *Fusarium spp.*, permitiría obtener información de utilidad, extrapolable a otras interacciones leguminosa-endofitos radicales.

En este capítulo nos interesa evaluar el efecto de la infección fúngica sobre el *fitness* vegetal, haciendo inferencias a partir de la base de la biomasa vegetal, la actividad fotosintética y el perfil metabolómico.

En el capítulo anterior (3), se expuso la obtención y selección de las cepas *F. oxysporum* (142L52A) y *F. solani* (142L52B) con aptitud de solubilizar fosfato inorgánico y con capacidad para tolerar alcalinidad y salinidad. Estos resultados, sumados al hecho de que estas cepas fueron obtenidas como endofitos de raíces de *L. tenuis*, sugiere que su inoculación a campo podría beneficiar el rendimiento de dicha forrajera.

Por otra parte, el género *Lotus* ofrece la posibilidad de realizar estudios en la especie *L. japonicus*, la cual ha sido adoptada por la comunidad científica como modelo para la investigación de leguminosas, debido a que ofrece todas las ventajas de otras especies vegetales modelos: tamaño del genoma pequeño, auto-fertilidad y un ciclo de vida corto (Udvardi y col., 2005; Sato y Tabata, 2006; Bordenave y col., 2013). Estas propiedades han determinado que en los últimos años, se hayan desarrollado numerosos recursos genéticos en *L. japonicus*, los cuales han contribuido significativamente al progreso del conocimiento en leguminosas (Perry y col., 2003; Gondo y col., 2007).

Es por ello, que en este trabajo de tesis resultó de interés la puesta a punto de un sistema experimental simbiótico entre *L. japonicus* y endofitos de *Fusarium spp.*, lo que permitiría obtener información de utilidad, extrapolable a otras interacciones entre leguminosas y endofitos radicales. En función de ello se propuso evaluar el efecto de la interacción fúngica sobre el *fitness* de la especie modelo, haciendo inferencias a partir de la base de la biomasa vegetal, la actividad fotosintética y la modificación del perfil metabólico de respuesta.

Hipótesis

Las cepas de *Fusarium*, *F. oxysporum* 142L52A y *F. solani* 142L52B, con capacidad de infectar los tejidos de raíces de *L. tenuis* y *L. japonicus* de manera asintomática, mejoran el *fitness* de ambos hospedantes.

Objetivos

1. Verificar el carácter endofítico de las cepas *F. oxysporum* 14L52A y *F. solani* 142L52B sobre *L. tenuis* y *L. japonicus*.
2. Evaluar el efecto de la interacción sobre:
 - El crecimiento y la biomasa vegetal.
 - El estado del Fotosistema II (PSII) y la actividad fotosintética de las plantas.
 - El estado del metabolismo primario.
3. Identificar posibles efectos de la interacción especie-específico entre ambas especies de hospedante.

Materiales y Métodos

Material biológico

Germoplasma

- *L. japonicus* ecotipo “*Gifu*”. Semillas provenientes de la producción del mes de Noviembre del año 2012, a partir de plantas reproducidas en las instalaciones del IIB-INTECH
- *L. tenuis* cultivar comercial “*Nahuel*”. Producida en la Pampa Deprimida y utilizada como recurso forrajero en la zona.

Se emplearon las cepas fúngicas *F. oxysporum* (142L52A) y *F. solani* (142L52B), previamente seleccionadas por su capacidad de solubilizar fosfato inorgánico y tolerancia a salinidad y alcalinidad (Capítulo 3).

Tratamiento pre-germinativo y desinfección

Las semillas fueron escarificadas con H₂SO₄ concentrado durante 3 minutos y con agitación. Posteriormente, se lavaron las semillas con agua corriente, para eliminar el ácido remanente. Las semillas se desinfectaron superficialmente con una solución de NaClO comercial en agua, en una concentración de 5%, durante 3 minutos. Posteriormente, se colocaron en agua destilada estéril durante una noche, para permitir el proceso de imbibición.

Las semillas embebidas fueron colocadas en placas de Petri con Medio Agar Agua (MAA) al 0.5% e incubadas en cámara de cultivo (ver “Condiciones de cultivo”), durante 12 días ó hasta la aparición de la primera hoja verdadera o trifoliada.

Inóculo fúngico

Se emplearon las cepas fúngicas *F. oxysporum* 142L52A y *F. solani* 142L52B previamente seleccionadas por su capacidad de solubilizar fosfato inorgánico y tolerancia a salinidad y alcalinidad (Capítulo 3).

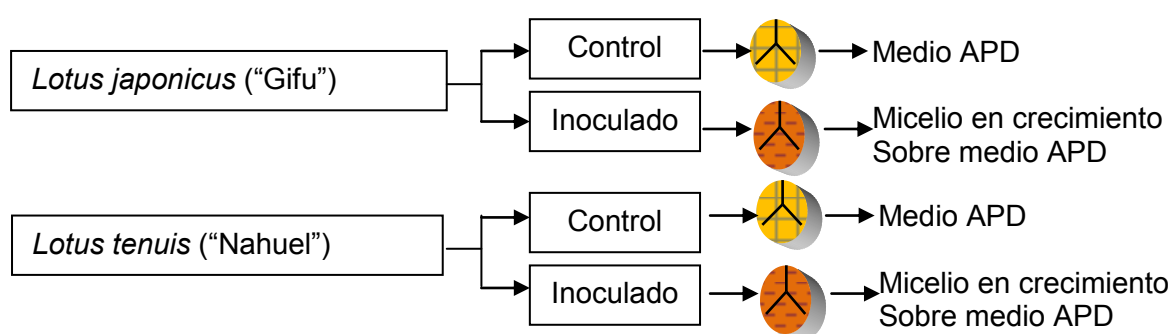
Se cultivaron las cepas de *Fusarium* en cajas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían APD, durante 10 días a 30°C, en oscuridad. El contenido de cada placa fue fraccionado en tres secciones. Cada tercio de medio APD con crecimiento fúngico fue transferido

(seccionado en porciones) a cada maceta para ser utilizado como inóculo. Para los tratamientos “Control”, se procedió del mismo modo, pero con medio APD estéril.

Diseño experimental

El diseño fue completamente aleatorizado. Por cada tratamiento, se prepararon diez réplicas, incluyendo algunas adicionales por eventuales muertes durante el trasplante.

Figura N° 4.2. Esquema de tratamientos utilizados para la evaluación de la interacción *Lotus spp-F. solani*.



Trasplante e inoculación

Para el cultivo de las plantas se utilizó como sustrato una mezcla de arena:perlita en una proporción 2:1. El sustrato se esterilizó en autoclave a 120 °C durante dos horas, en dos ciclos sucesivos, separados por 48 horas. Previamente al proceso de esterilización, el material se humedeció con agua destilada, hasta alcanzar la saturación del mismo, para garantizar una correcta esterilización.

Se llenaron, macetas de 20 ml de capacidad con la mezcla de sustratos hasta 1 cm por debajo del borde superior de la misma, luego se agregó el inóculo del hongo y finalmente se completó con el resto del sustrato, al ras del borde de la maceta.

Se colocaron las plántulas cuidadosamente sobre las macetas preparadas previamente, cuidando de manipular las raíces lo menos posible, para evitar el daño sobre los pelos absorbentes. Los tratamientos, tanto control, como inoculados, se realizaron por decuplicado.

Condiciones de cultivo

Las plantas fueron cultivadas en cámara de crecimiento con una temperatura de 24°C/19°C (día/noche), fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad), humedad del 60% e intensidad lumínica de 240 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$. El período de crecimiento se extendió durante 35 días post inoculación (dpi), sin llegar a la etapa de floración de las plantas de *L. japonicus*. Las macetas se irrigaron con solución nutritiva “Evans” (Tabla N° 4.1). La preparación de 1 litro de solución final de riego se realizó tomando 1 ml de cada una de las soluciones stock, a excepción de la solución 6, de la cual se tomaron 35 ml y llevando a volumen final de 1 litro con agua destilada.

Tabla N° 4.1. Composición de las soluciones stock para la preparación de la solución nutritiva de riego “Evans”.

Nutriente		Sal	Concentración
Solución 1	Azufre	K ₂ SO ₄	28.88 gr/l
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	49.28 gr/l
Solución 2	Fósforo	KH ₂ PO ₄	2.3 gr/l
		K ₂ HPO ₄	14.5 gr/l
Solución 3	Calcio	CaSO ₄ ·2H ₂ O	10.33 gr/l
		CaCl ₂ ·2H ₂ O	7.35 gr/l
Solución 4	Hierro	FeNaEDTA	0.667 gr/l
Solución 5	Micronutrientes	H ₃ BO ₃	0.143 gr/l
		MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.077 gr/l
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.022 gr/l
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0079 gr/l
		Na ₂ MoO ₄	0.042 gr/l
		ClCa ₂ ·6H ₂ O	0.012 gr/l
Solución 6	Nitrógeno	NH ₄ NO ₃	2.86 gr/l

Control de infección

A partir de secciones de la raíz de 10 plantas de cada tratamiento, se procedió a realizar la desinfección superficial detallada previamente en el capítulo 3. Se re-aislaron los crecimientos obtenidos y se repicaron en medio de cultivo APD fresco. Se compararon fenotípicamente los crecimientos fúngicos obtenidos para confirmar la naturaleza endofítica de las cepas.

Por otro lado, se realizó la clarificación de secciones de raíces con KOH al 10%, a 95°C, durante diez minutos. Posteriormente, el material se acidificó con HCl 0.1 N y se tiñó con una solución de Azul de Tripán en Ácido láctico al 0.05%, a 95°C, durante 5 minutos. Los segmentos se observaron en microscopio con un aumento de 400x a fines de identificar mediante la tinción, el micelio infectivo.

Evaluación del crecimiento de las plantas

Una vez finalizado el periodo de crecimiento, se cosecharon las plantas y se seccionó la raíz del vástago. Se registró el peso seco de cada sección de las plantas y se tomó una alícuota del sistema radical para realizar el control de infección.

A tiempo final, se tomaron medidas del número de brotes y área foliar de hojas cosechadas aleatoriamente.

Evaluación de la actividad fotosintética a tiempo final

Transcurridos 35 dpi se realizó la determinación de los parámetros fotosintéticos. Mediante el uso de un analizador de CO₂ (IRGA PP Systems), se realizó la cuantificación de la Fotosíntesis Neta (PN), la conductancia estomática (SC) y la concentración de carbono (C) en la cámara sub-estomática (CI). A partir de los parámetros PN y SC se realizó el cálculo de la Eficiencia en el Uso del Agua (EUA). Las condiciones de medición fueron a 240 fotones m²s⁻¹.

Evaluación del estado del PSII

Mediante la utilización de un fluorómetro (Pocket PEA, Hansatech Instruments), se realizó la determinación de los parámetros relacionados a la fluorescencia de la clorofila, con especial énfasis en el Rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II (Fv/Fm) e Índice de Performance (Plabs).

- Rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m)

$$F_v/F_m = F_m - F_0 / F_m$$

Donde:

F_v = $F_m - F_0$, fluorescencia variable máxima

F_m = fluorescencia máxima de la curva OJIP

- Índice de la conservación de la energía desde fotones absorbidos por el PSII hasta la reducción de Q_B (Quinona B): Índice de performance (Plabs)

$$Plabs = \gamma_{rc} / (1 - \gamma_{rc}) \cdot \phi_{po} / (1 - \phi_{po}) \cdot \Psi_{eo} / (1 - \Psi_{eo})$$

Donde:

γ_{rc} = Probabilidad que una molécula de clorofila del PSII funcione como Centro de Reacción

ϕ_{po} = F_v/F_m . Máximo rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria del PSII

Ψ_{eo} = Probabilidad que un exciton atrapado mueva un electrón en la cadena transportadora de electrones mas allá de Quinona A (Q_A)

ϕ_{eo} = Rendimiento cuántico de la cadena transportadora de electrones del PSII.

Análisis del metabolismo primario resultante de la interacción *Lotus spp-Fusarium solani*

Luego de la cosecha del material vegetal y su conservación a -80°C , se realizó la molienda y extracción de los metabolitos polares, de acuerdo al procedimiento detallado en Lisec y colaboradores (2006). La extracción a partir de material fresco fue realizada mediante 300 μl de Metanol – 200 μl de Cloroformo. Se utilizó como estándar interno una solución de Ribitol- ^{13}C en metanol.

Para el análisis se utilizaron 160 μl de la fracción polar resultante de la extracción, el cual fue secado al vacío a temperatura ambiente y conservado a -20°C hasta su posterior acondicionamiento para el análisis a través de GC-EI/TOF-MS.

Las muestras fueron resuspendidas en metanol y derivatizadas mediante reactivos de metoxiaminación, de acuerdo con los procedimientos detallados por Lisec y colaboradores en el año 2006.

El análisis fue realizado mediante el uso de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, con detector de ionización de impacto electrónico y Tiempo de vuelo (GC-EI/TOF-MS). La inyección de la muestra se realizó en columna capilar *FactorFour VF-5ms*, de 30 metros de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor (Varian-Agilent Technologies), la cual fue conectada a un espectrómetro de masas *Time Of Flight Pegasus III Time-Of-Flight Mass Spectrometer* (LECO Instrumente GmbH, Mönchengladbach, Alemania).

En análisis de los cromatogramas, e identificación de los metabolitos fueron realizados por el servicio técnico del Instituto Max Planck, Potsdam, Alemania, mediante la utilización del Software *ChromaTOF* versión 4.32 (LECO, St. Joseph, USA) y el software *TagFinder* (Luedemann y col., 2008). Los compuestos fueron identificados a través del espectro de masas y el índice de tiempo de retención, mediante comparación con la información de referencia en la base de datos *Golm Metabolome Database (GMD)*, Hummel y col., 2010) y el espectro de masas a través de la base de datos *NIST08 database*.

Todos los registros de masas del experimento fueron normalizados por peso fresco y por el registro de masa correspondiente al estándar interno. Los valores de masas de cada sustancia, por cada muestra fueron normalizados a la mediana de los valores de cada sustancia en todas las muestras y transformada logarítmicamente para su posterior análisis estadístico.

Debido a la diferencia entre los metabolismos de raíz con los de la parte aérea, se procedió a realizar los análisis estadísticos por separado. En ambos casos se compararon los tratamientos “Control” e “Inoculado” para ambas especies mediante una prueba de comparación de medias T-Test, con un nivel de significancia de 0.05.

Se tomaron como metabolitos representativos aquellos que presentaban una cobertura de al menos el 70% de presencia en las muestras de un mismo tratamiento.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron comparando los tratamientos “Control” e “Inoculado” para cada una de las especies y órganos, mediante la Prueba de comparación de medias T-Test, con una significancia de $p < 0.05$. En el caso de que no se cumpliesen los supuestos de normalidad y/o homocedasticidad de las varianzas, se realizó el test no paramétrico Wilcoxon-Test, con el mismo nivel de significancia.

Mediante un PCA se realizó un ordenamiento, con los metabolitos que registraron diferencias estadísticamente significativas en al menos una de las comparaciones entre los tratamientos, realizadas mediante la prueba T-Test ($p < 0.05$).

Resultados

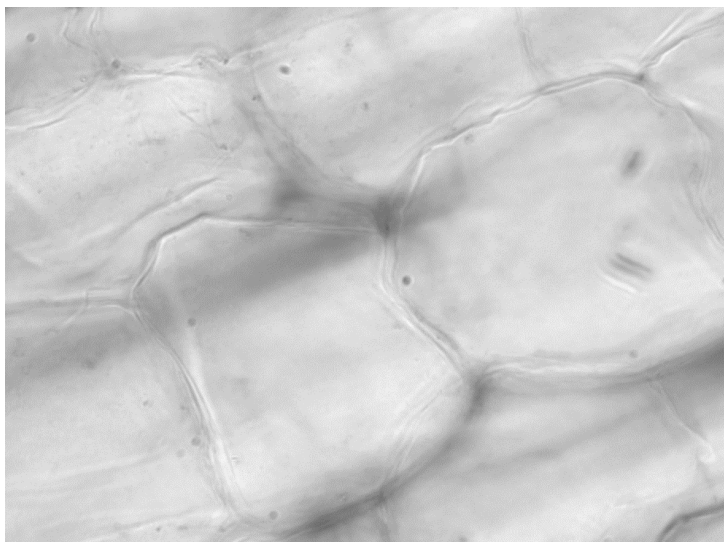
Ambas cepas (142L52A y 142L52B) infectaron las dos especies de *Lotus*, pero mientras *L. tenuis* permaneció asintomática luego de la infección con *F. oxysporum* (142L52A), las plantas de *L. japonicus* murieron. No ocurrió lo mismo en el caso de la cepa *F. solani* (142L52B). La infección de ambas especies de *Lotus* con ésta cepa fue asintomática.

Por este motivo, y a fin de evaluar comparativamente las respuestas entre *L. tenuis* y *L. japonicus*, se prosiguieron los análisis sobre la interacción entre los bio-sistemas *L. tenuis*-*F. solani* y *L. japonicus*-*F. solani*, dejándose de lado a la cepa *F. oxysporum* (142L52A).

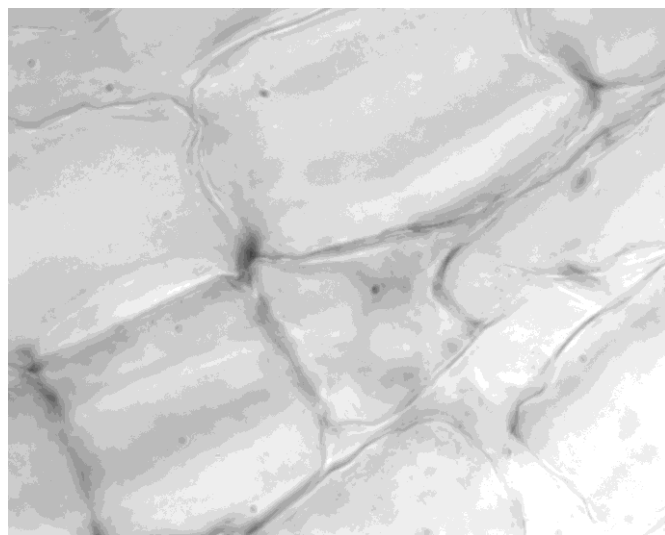
Las observaciones realizadas mediante microscopía, indicaron que la infección de *F. solani* (142L52B) fue intercelular, registrándose en la región de las células corticales de las raíces de ambas especies de *Lotus*, evaluadas como hospedantes. (Figura N° 4.3).

Figura N°4.3. Imágenes tomadas con microscopio óptico a 400x, de las tinciones de micelio con colorante azul de tripan. a) Células de la corteza de la raíz de *L. japonicus* en condiciones "Control"; b) células de la corteza de la raíz de *L. tenuis* en condiciones "Control"; c) y d): células de la corteza de la raíz de *L. japonicus* inoculadas con micelio y esporas de *F. solani*; e), células de la corteza de la raíz de *L. tenuis* inoculadas con micelio de *F. solani*. H: hifas de *F. solani* (142L52B), e: esporas de *F. solani* (142L52B)

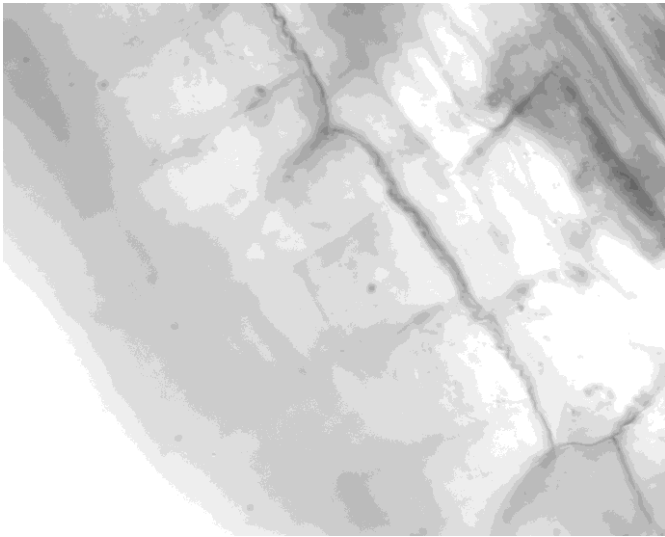
a)



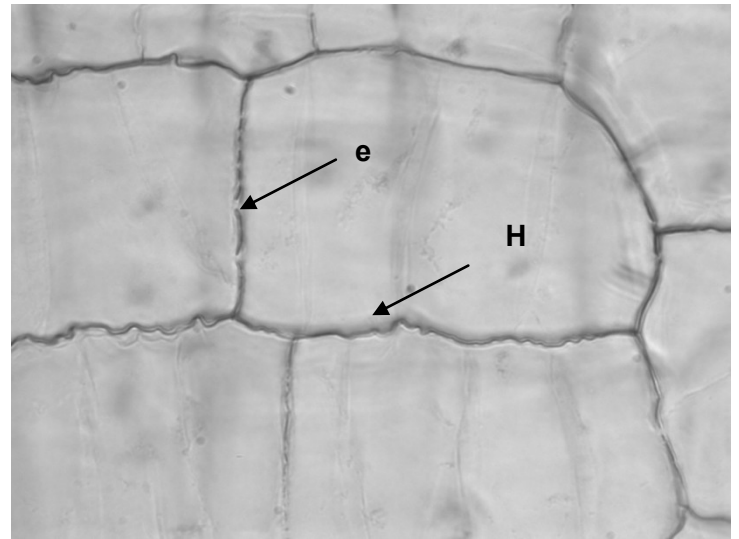
b)



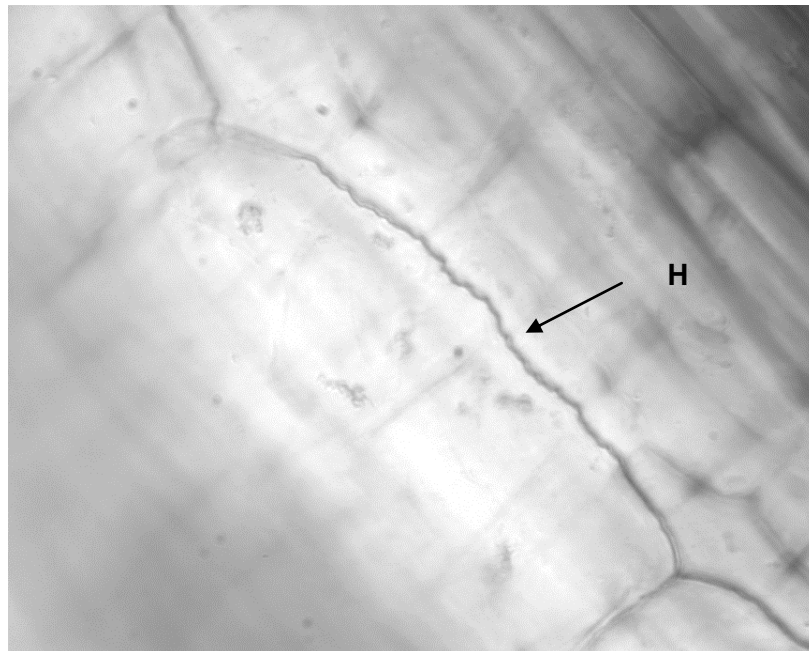
c)



d)



e)



Efecto del endofito sobre el desarrollo del hospedante

El ensayo de interacción de las especies de *Lotus* con *F. solani* (142L52B), permitió observar que ninguna de las dos presentaron síntomas visibles de daño durante el periodo de crecimiento. Sin embargo, luego de la cosecha, pudo determinarse un efecto de promoción de crecimiento en *L. japonicus* bajo el efecto del endofito, mientras que en *L. tenuis* se observó el efecto contrario (Figuras N° 4.4; 4.5; 4.6).

Figura N° 4.4. Apariencia de las plantas de *L. japonicus* y *L. tenuis* inoculadas con *F. solani* (142L52B), cosechadas 35 dpi. a) *L. japonicus* Control; b) *L. japonicus* Inoculado; c) *L. tenuis* Control; d) *L. tenuis* inoculado.

a)

b)



c)

d)



Figura N° 4.5. Biomasa aérea, expresada como mg de peso seco de vástago, para cada una de las especies evaluadas: a) *L. japonicus* y b) *L. tenuis*, inoculadas con *F. solani* (142L52B), luego de 35 dpi. * diferencias significativas (T-Test; $p < 0.05$)

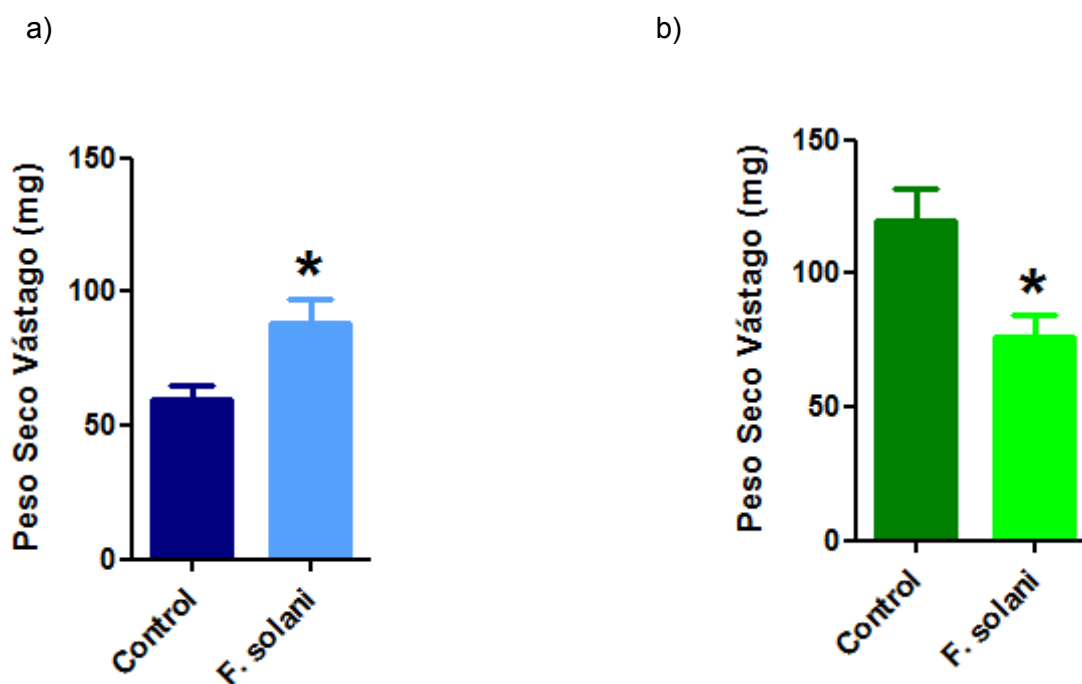


Figura N° 4.6. Biomasa radical, expresada como mg de peso seco de vástago, para cada una de las especies evaluadas: a) *L. japonicus* y b) *L. tenuis*, inoculadas con *F. solani* (142L52B), luego de 35 dpi. * diferencias significativas (T-Test; $p < 0.05$); * diferencias significativas (Wilcoxon Test; $p < 0.05$).

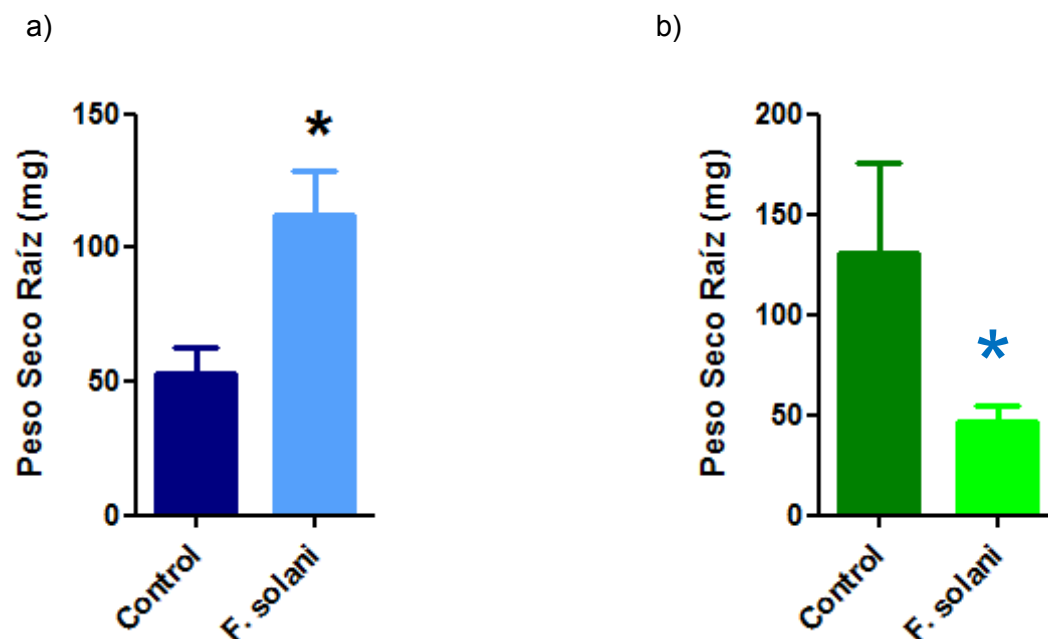
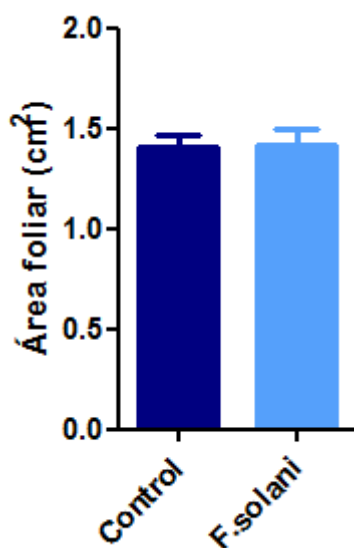


Figura N° 4.7. Área foliar, expresada en cm^2 , para cada una de las especies evaluadas: a) *L. japonicus* y b) *L. tenuis*, inoculadas con *F. solani* (142L52B), cuantificadas luego de 35 dpi.

a)



b)

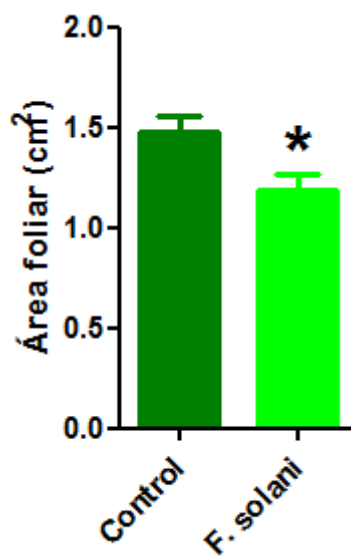
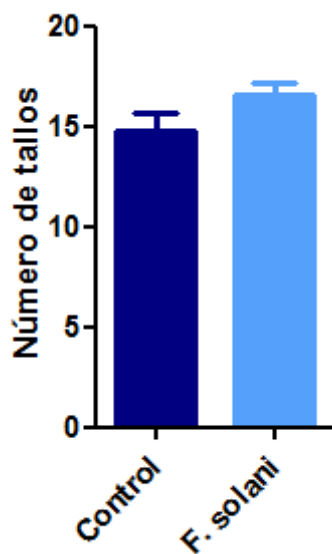
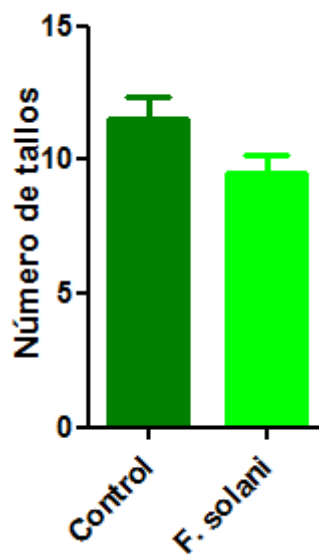


Figura N° 4.8. Número de tallos, para cada una de las especies evaluadas: a) *L. japonicus* y b) *L. tenuis*, inoculadas con *F. solani* (142L52B), cuantificadas luego de 35 dpi.

a)



b)



En cuanto al número de ramificaciones, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los hospedantes (Figuras N° 4.8), aunque se observó una tendencia a la disminución de dicho parámetro en *L. tenuis*, y una tendencia a lo contrario en *L. japonicus*.

Asimismo, pudo determinarse que el área foliar de *L. tenuis* disminuyó como consecuencia de la interacción con *F. solani* (142L52B), no ocurriendo lo mismo con *L. japonicus*.

Evaluación de los parámetros fotosintéticos a tiempo final.

No se observaron diferencias significativas entre plantas inoculadas y control, respecto de PN y SC (Figuras N° 4.9 y 4.10). Sin embargo, se registró un aumento en el uso eficiente del agua (UEA) en plantas de *L. japonicus* inoculadas con *F. solani* (142L52B) respecto de su control (Figura N° 4.11).

Figura N° 4.9. Intercambio de CO_2 o Fotosíntesis Neta (PN), expresada como $\mu\text{MolCO}_2/\text{m}^2$. a) *L. japonicus* y b) *L. tenuis*, inoculadas con *F. solani* (142L52B), cuantificadas luego de 35 dpi.

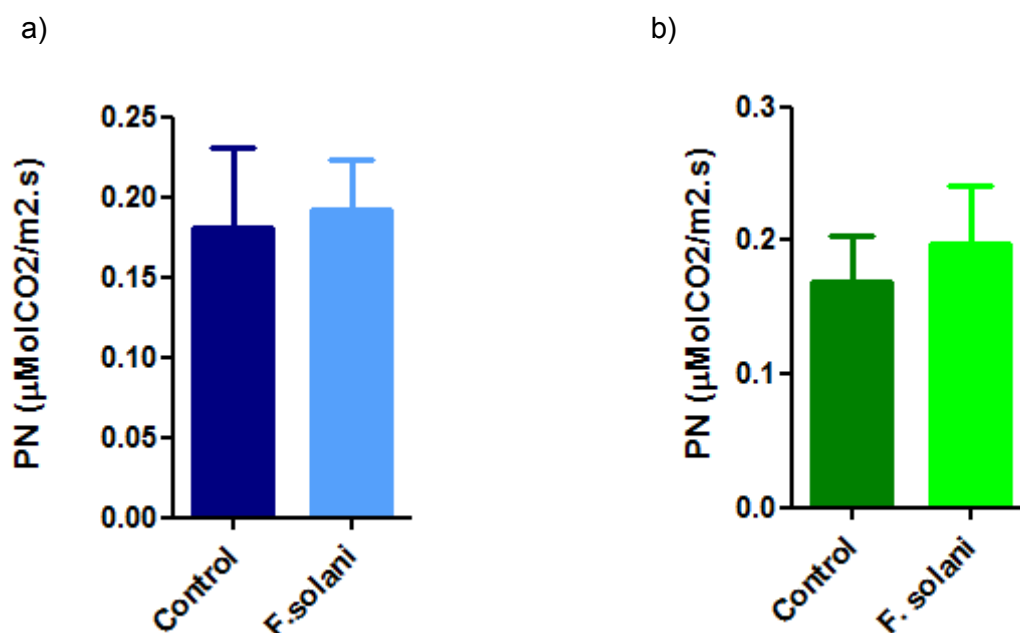


Figura N° 4.10. Conductancia estomática (SC), expresada como $\text{mMol/m}^2\cdot\text{s}$. a) *L. japonicus* y b) *L. tenuis*, inoculadas con *F. solani* (142L52B), cuantificadas luego de 35 dpi.

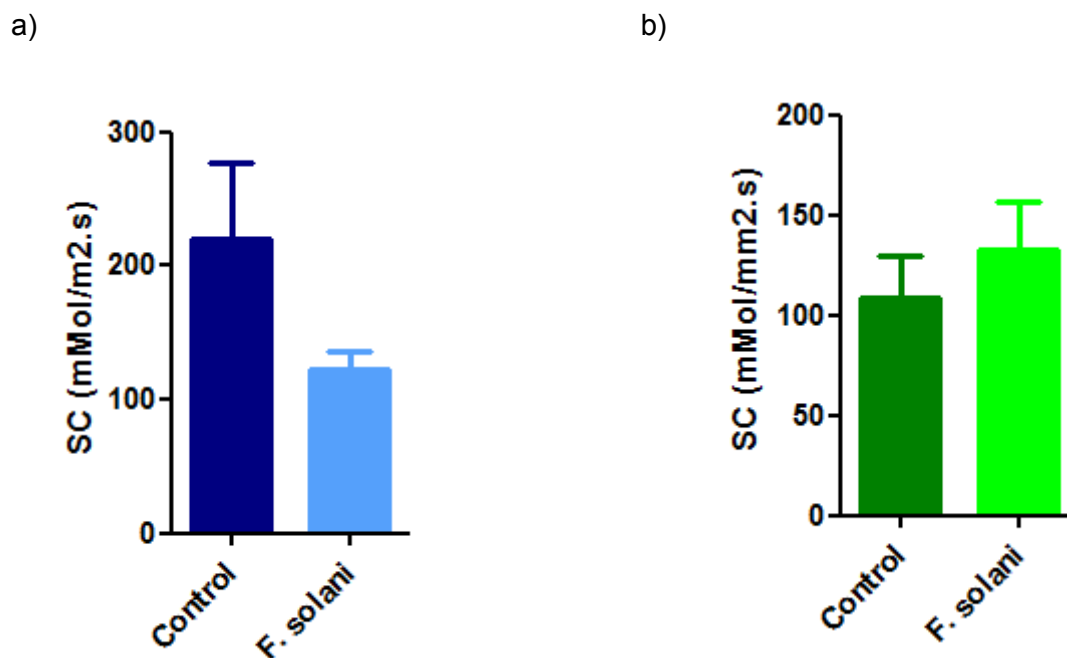


Figura N° 4.11. Eficiencia en el uso del agua (EUA), cuantificada a tiempo final, luego de 35 dpi. a) *L. japonicus* y b) *L. tenuis*, inoculadas con *F. solani* (142L52B), cuantificadas luego de 35 dpi. * diferencias significativas (T-Test; $p < 0.05$)

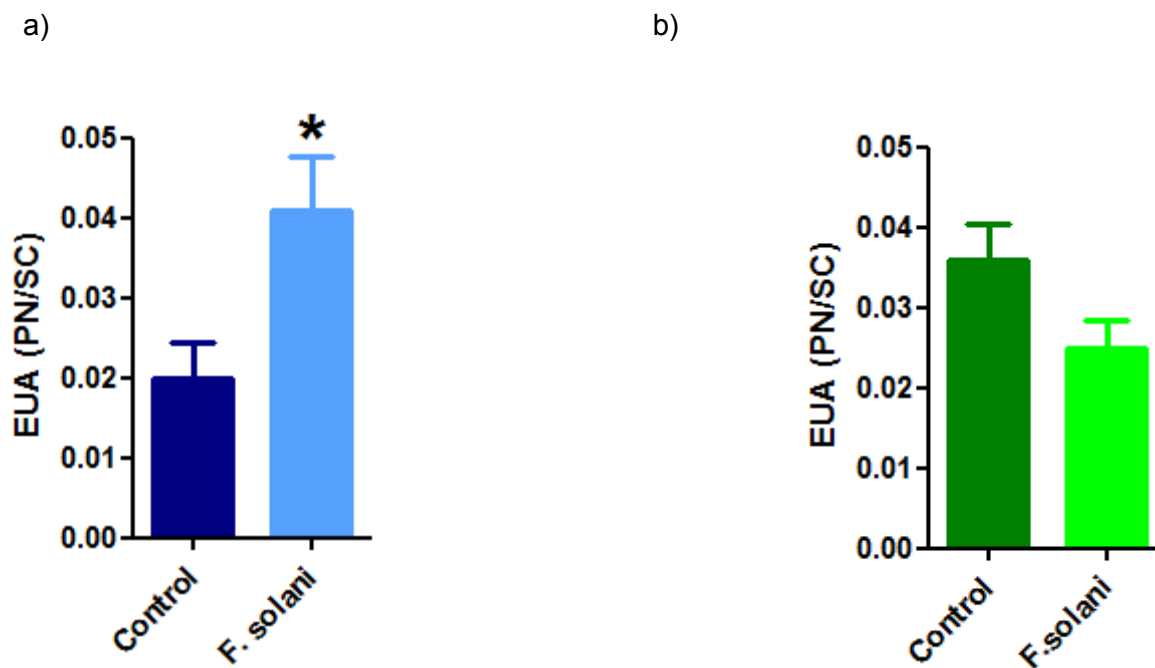
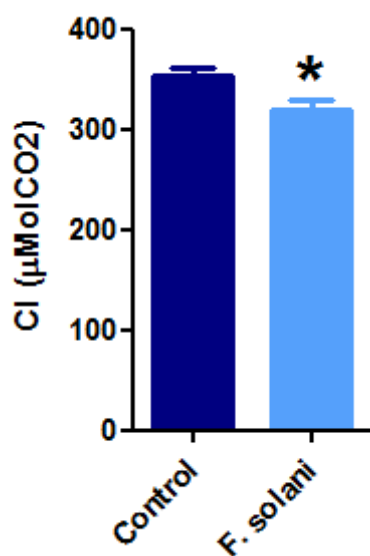
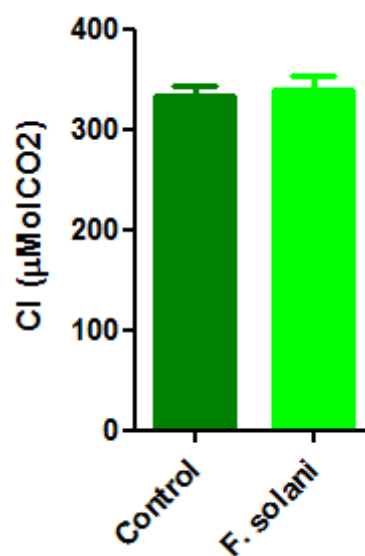


Figura N° 4.12. Eficiencia en la fijación de CO² (CI), cuantificada a tiempo final, luego de 35 dpi. a) *L. japonicus* y b) *L. tenuis*, inoculadas con *F. solani* (142L52B), cuantificadas luego de 35 dpi. * diferencias significativas (T-Test; p<0.05)

a)



b)

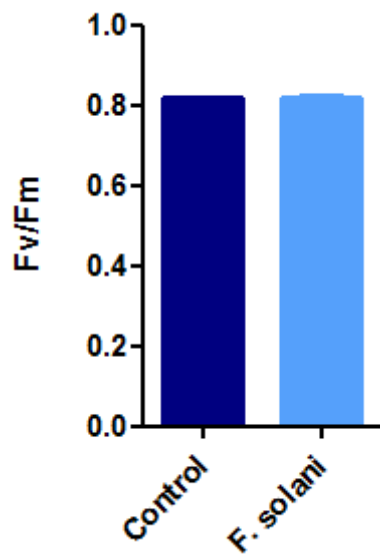


Evaluación de parámetros relacionados al funcionamiento del Fotosistema II

El parámetro “Rendimiento Cuántico Máximo del Fotosistema II (Fv/Fm), no mostró diferencias significativas ocasionadas por la inoculación con *F. solani* (142L52B), en ninguna de las especies evaluadas. (Figura N° 4.13). Por otra parte, los valores del Índice de *Performance* (Plabs), indicaron que *L. tenuis* registró una disminución significativa del mismo, como consecuencia de la interacción con el endofito. (Figura N° 4.14 b), mientras que no hubo diferencias estadísticamente significativas en plantas de *L. japonicus* bajo idéntico tratamiento (Figura 4.14.a).

Figura N° 4.13. Rendimiento Cuántico Máximo del Fotosistema II (Fv/Fm), registrado a tiempo final, luego de 35 dpi. a) *L. japonicus* y b) *L. tenuis*, inoculadas con *F. solani* (142L52B), cuantificadas luego de 35 dpi.

a)



b)

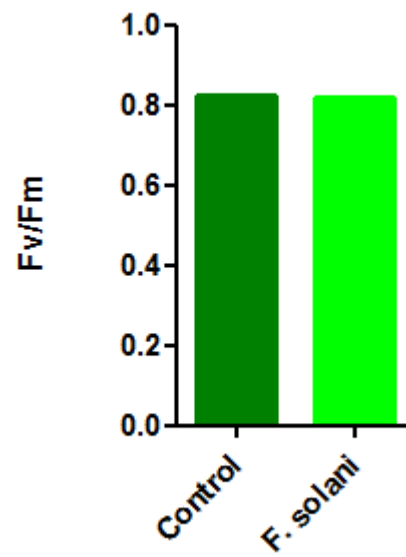
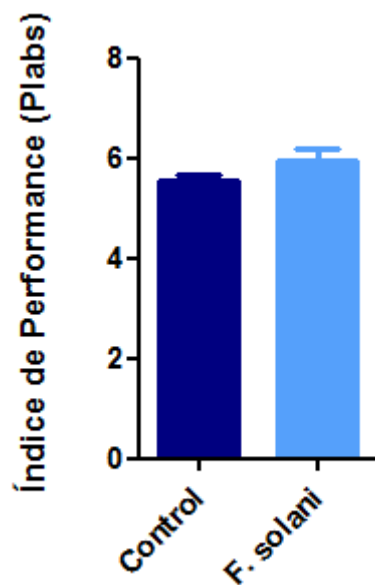
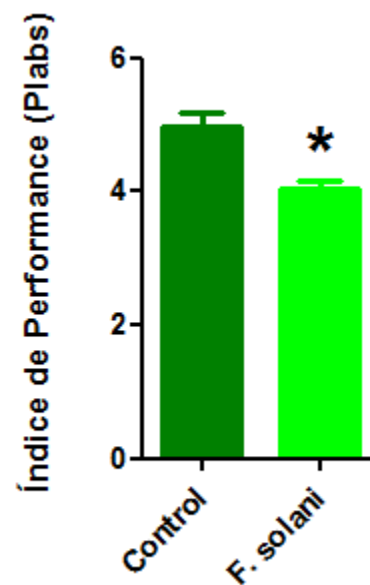


Figura N° 4.14. Índice de *Performance* (Plabs), registrado a tiempo final, luego de 35 dpi. a) *L. japonicus* y b) *L. tenuis*, inoculadas con *F. solani* (142L52B), cuantificadas luego de 35 dpi. * diferencias significativas (T-Test; $p < 0.05$).

a)



b)



Perfil metabólico resultante de la interacción *Lotus spp-F. solani*

Como resultado del análisis del metaboloma en raíces y en hojas de las plantas inoculadas y control, se identificaron 185 metabolitos y 21 sustancias clasificadas como “información alternativa”, haciendo uso de las bases de datos *GMD* y *NIST08*.

Los niveles de azúcares simples, tanto en hojas como en raíces de *L. japonicus*, se observaron incrementados con la inoculación con *F. solani* (142L52B). En el caso de *L. tenuis* se observó el efecto contrario, con una disminución de los niveles de fructosa, glucosa y sacarosa en raíces y hojas.

En ambas especies se observó un incremento en los niveles de maltosa, siendo significativo solamente en las hojas de *L. japonicus*.

Figura N° 4.15. Azúcares detectadas en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).

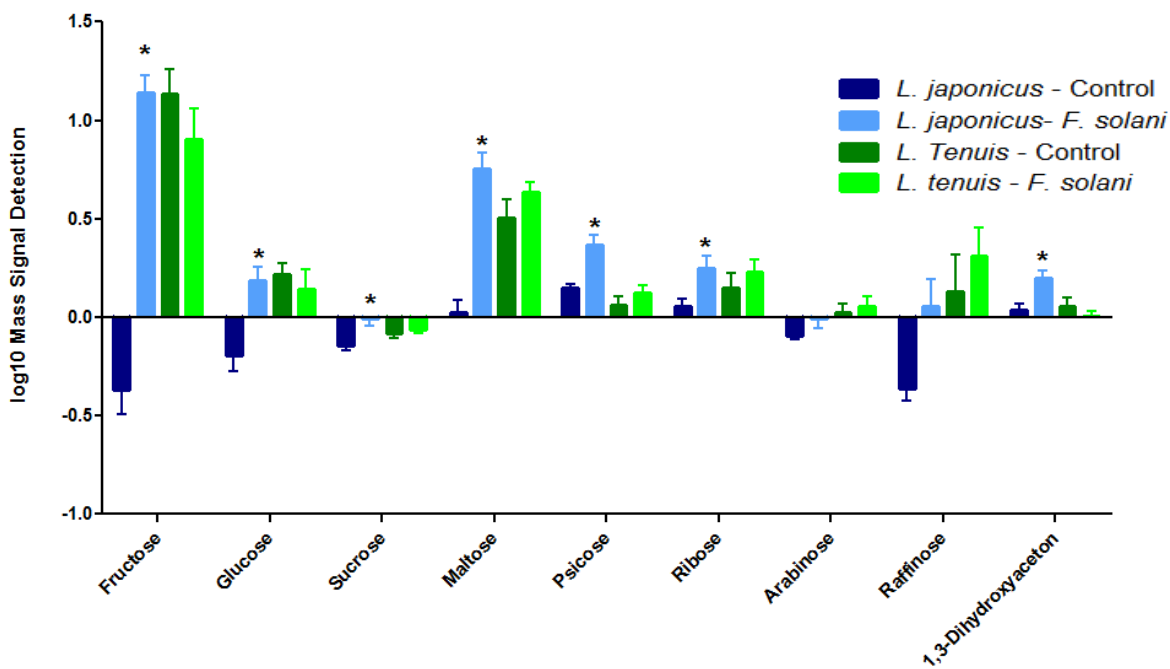
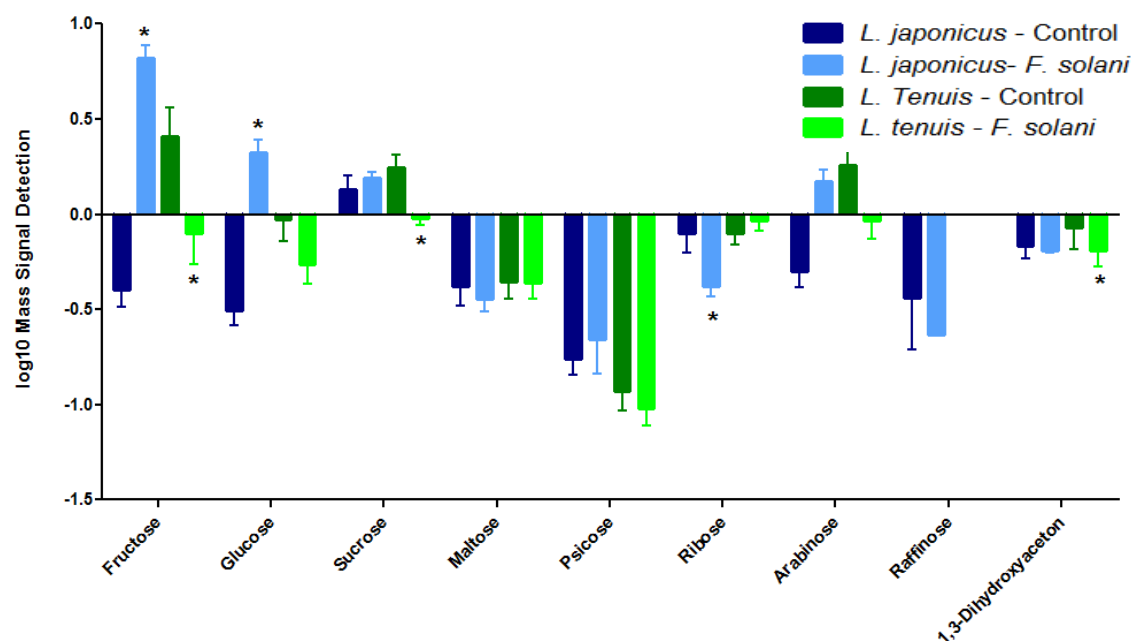


Figura N° 4.16. Azúcares detectadas en raíces mediante GS-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando los tratamientos: Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).



Se observó una disminución significativa de algunos aminoácidos en ambas especies de *Lotus*, debido a la interacción con *F. solani* (142L52B), a excepción del ácido gamma- 4-amino butanoico (GABA). Los niveles de GABA se incrementaron en ambas especies, pero sólo significativamente en *L. japonicus* (Figura N° 4.17).

Figura N° 4.17. Aminoácidos detectados en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).

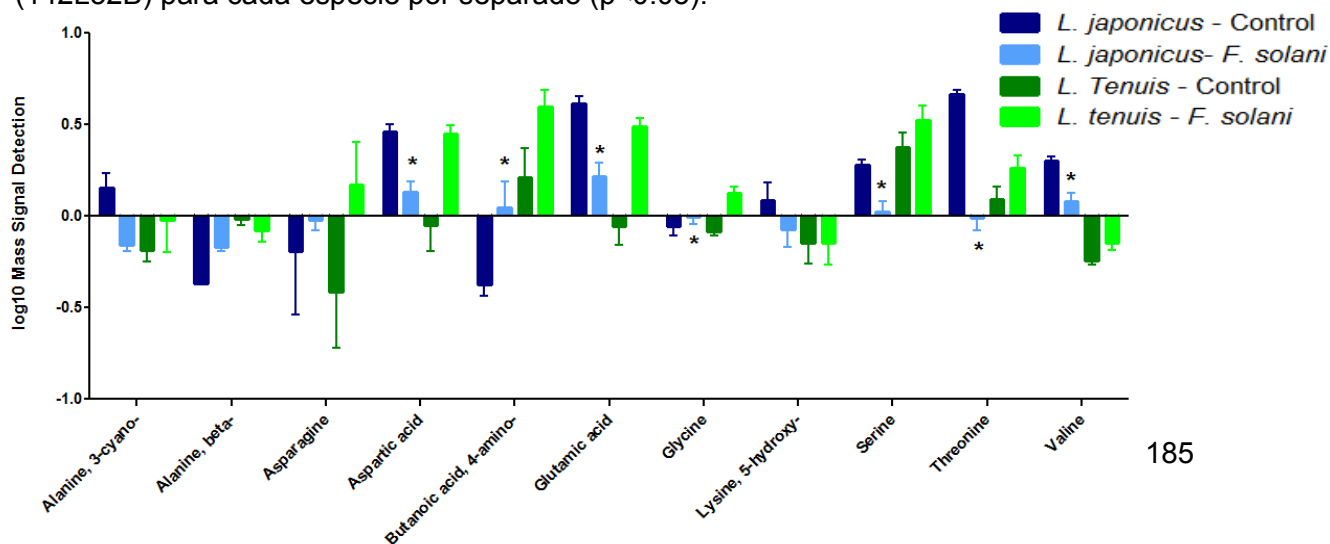


Figura N° 4.18. Aminoácidos detectados en raíces mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).

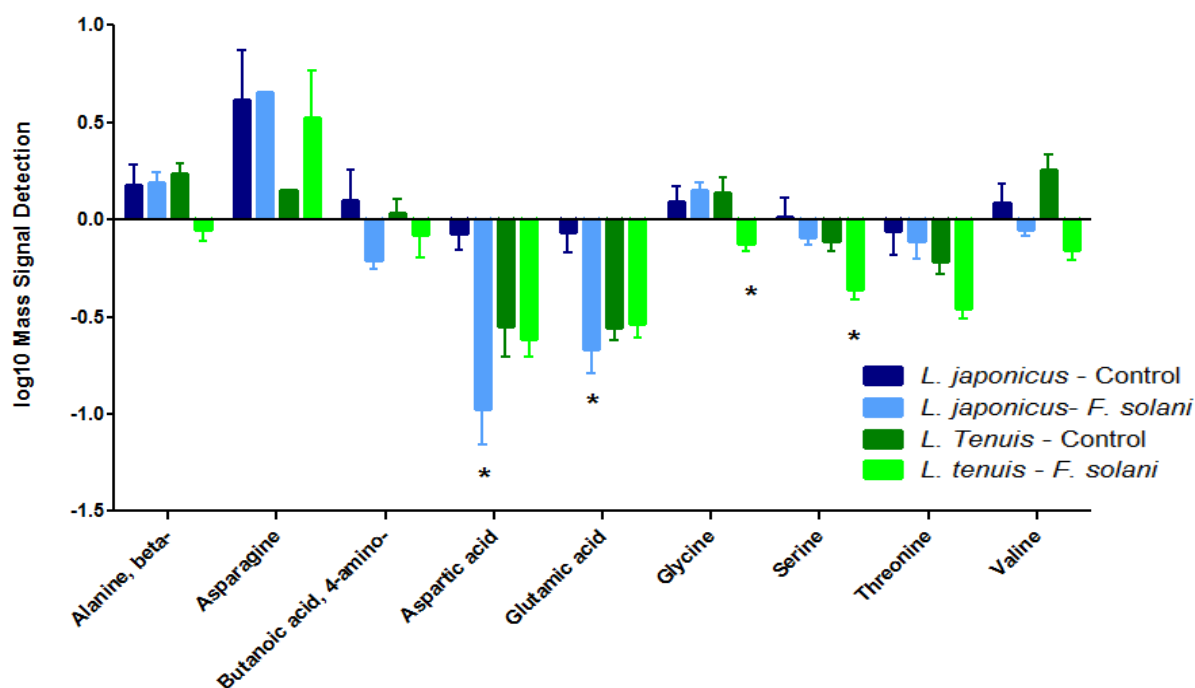


Figura N° 4.19. Ácidos orgánicos detectados en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).

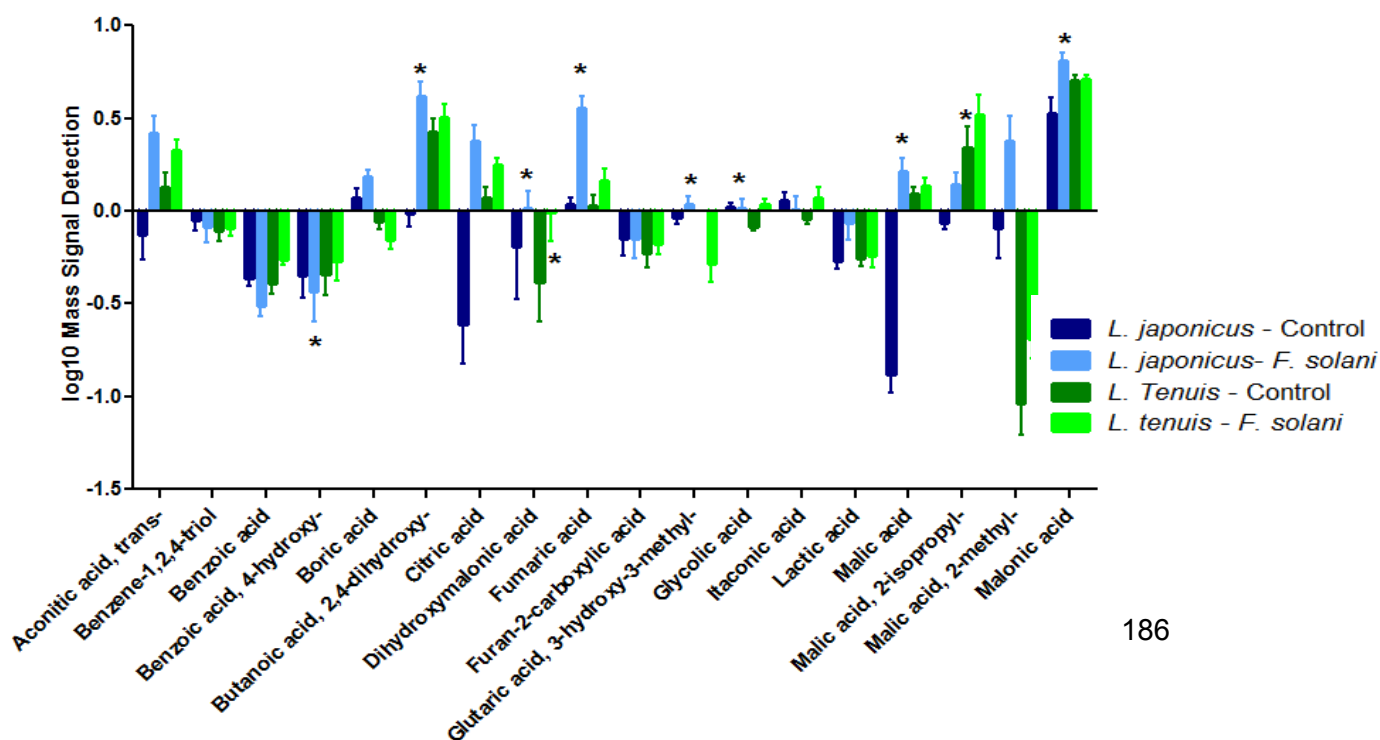
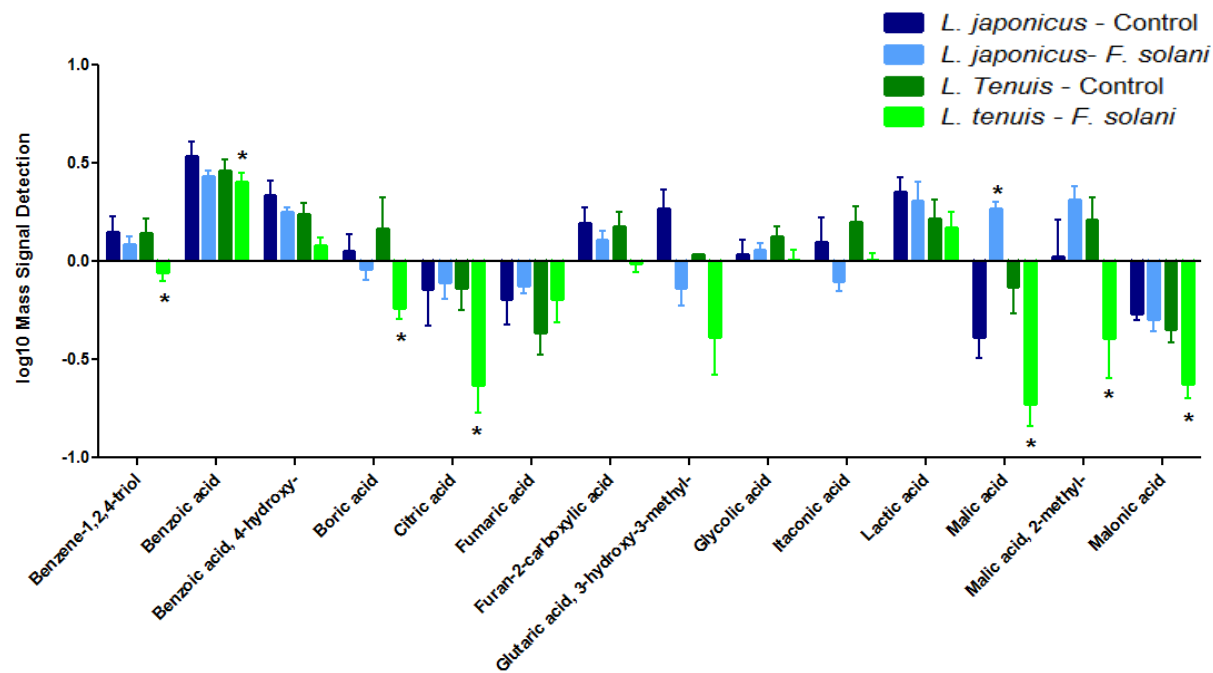


Figura N° 4.20. Ácidos orgánicos detectados en raíces mediante GS-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).



Los niveles de ácido fosfórico se incrementaron significativamente en *L. japonicus* inoculado con *F. solani* (142L52B), tanto en hojas como en raíces. Por su parte, en hojas de *L. japonicus* se evidenció además, un incremento significativo en otros compuestos fosforados, como el éster monometil de ácido fosfórico y el glicero-fosfo-glicerol (Figura N° 4.21). Por el contrario, en el caso de *L. tenuis* no pudieron observarse diferencias significativas en los niveles de fosfatos, debidos a la interacción con *F. solani* (142L52B). Es importante destacar que si bien no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, los niveles de algunos fosfatos se vieron disminuidos en raíces en comparación con lo que ocurría simultáneamente en las hojas analizadas, en donde en todos los casos pudo observarse un aumento en los niveles de los compuestos fosforados (Figura N° 4.22).

Figura N° 4.21. Fosfatos detectados en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).

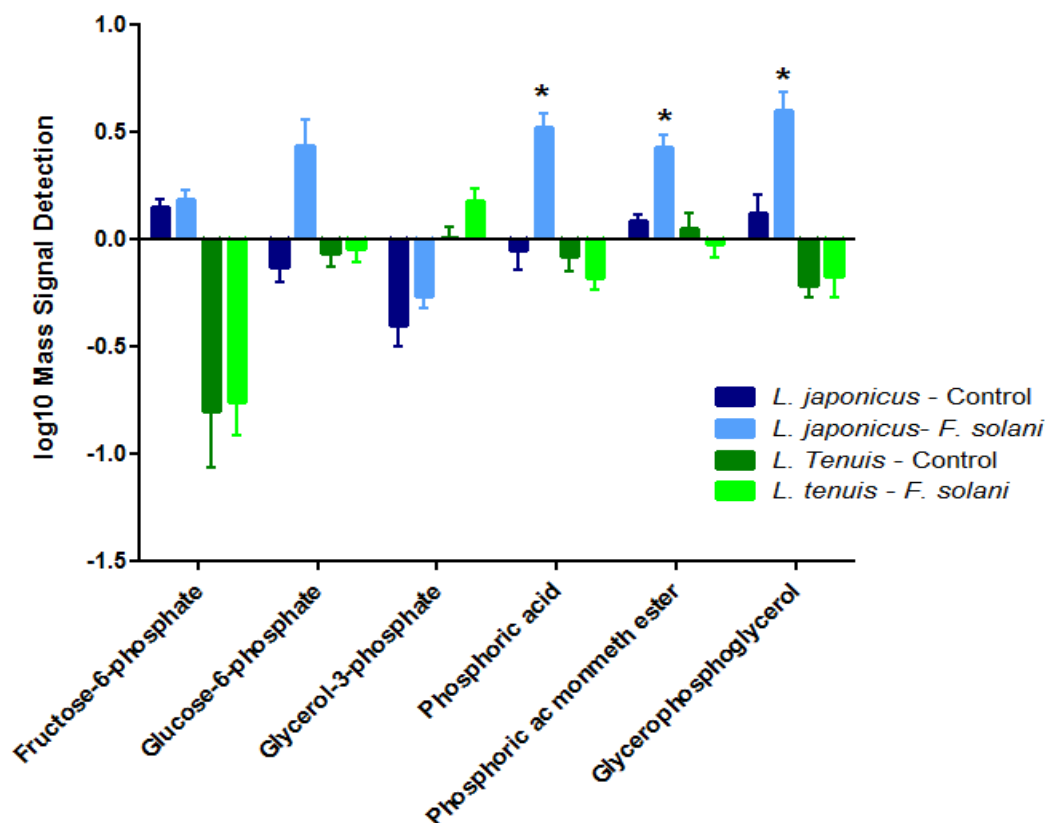


Figura N° 4.22. Fosfatos detectados en raíces mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).

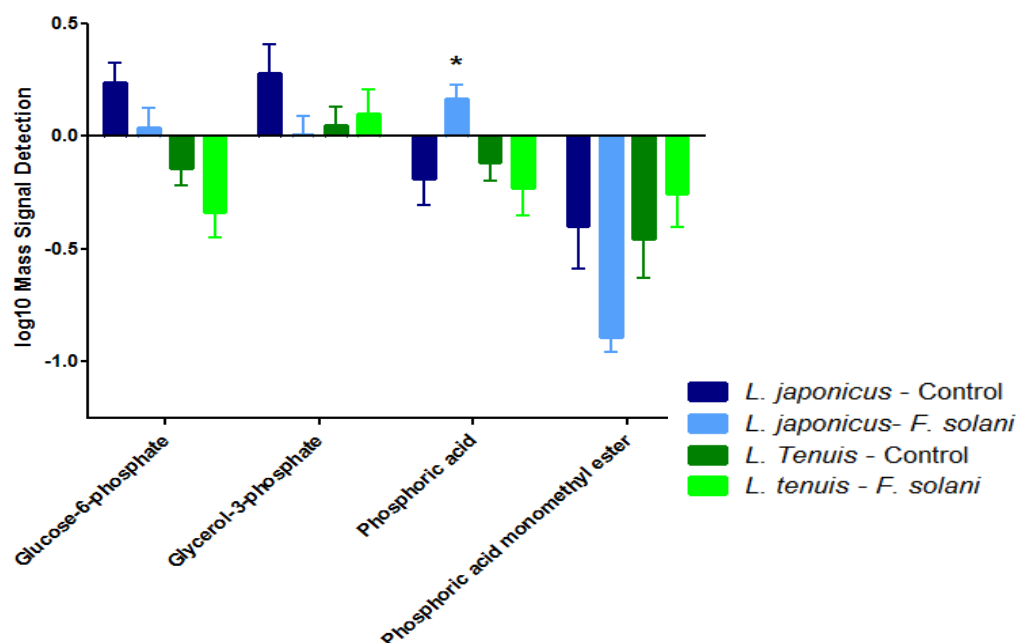


Figura N° 4.23. Fenilpropanoides detectados en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).

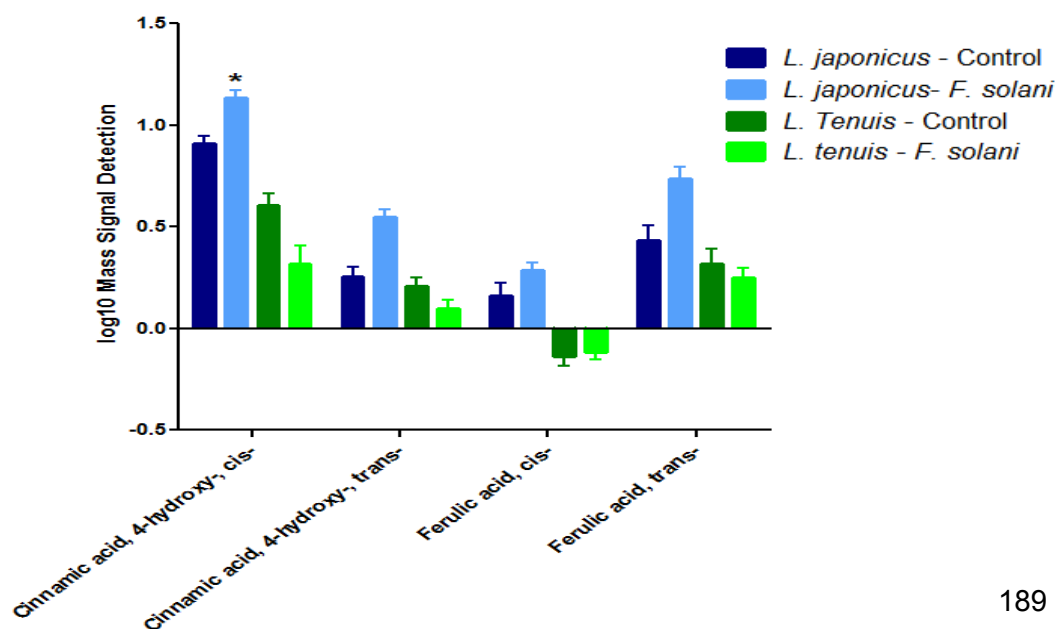


Figura N° 4.24. Fenilpropanoides detectados en raíces mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).

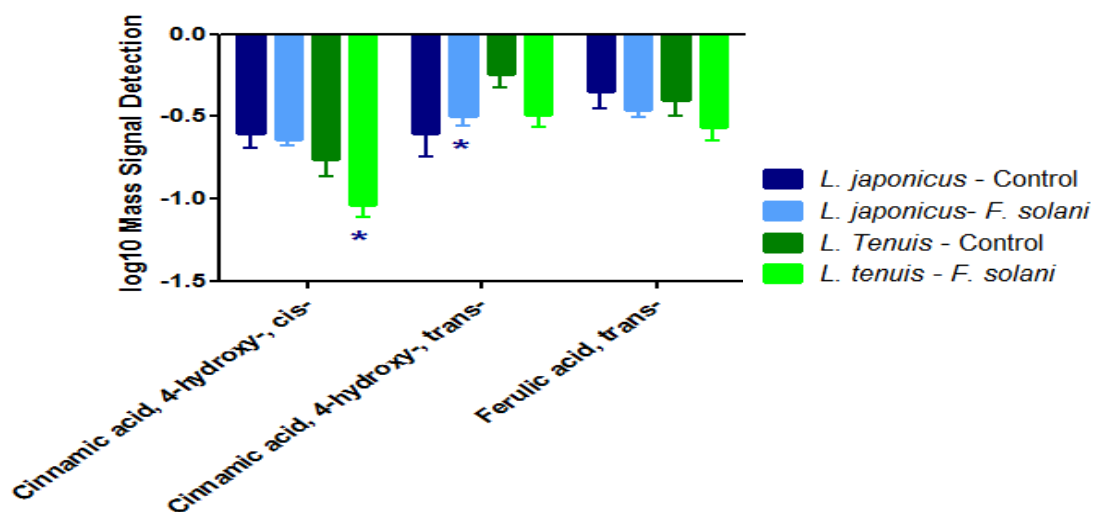


Figura N°4.25. Polioles detectados en hojas mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).

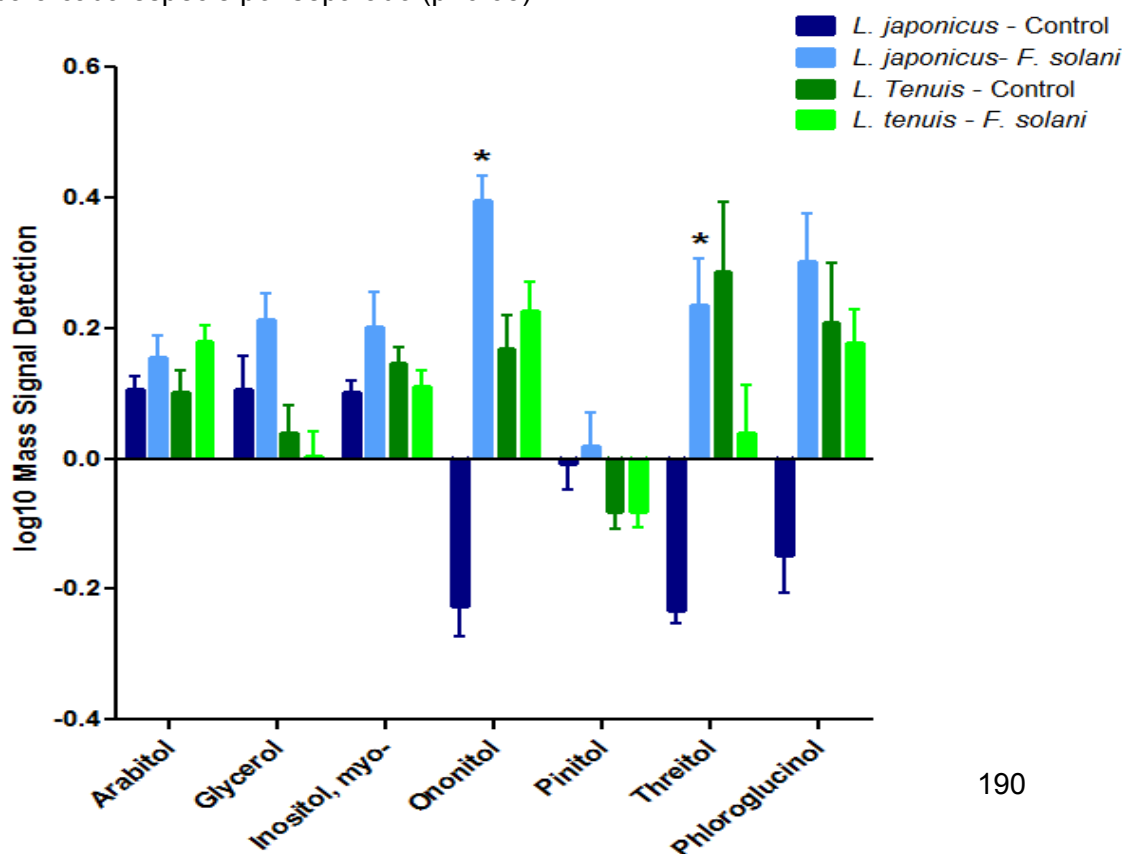
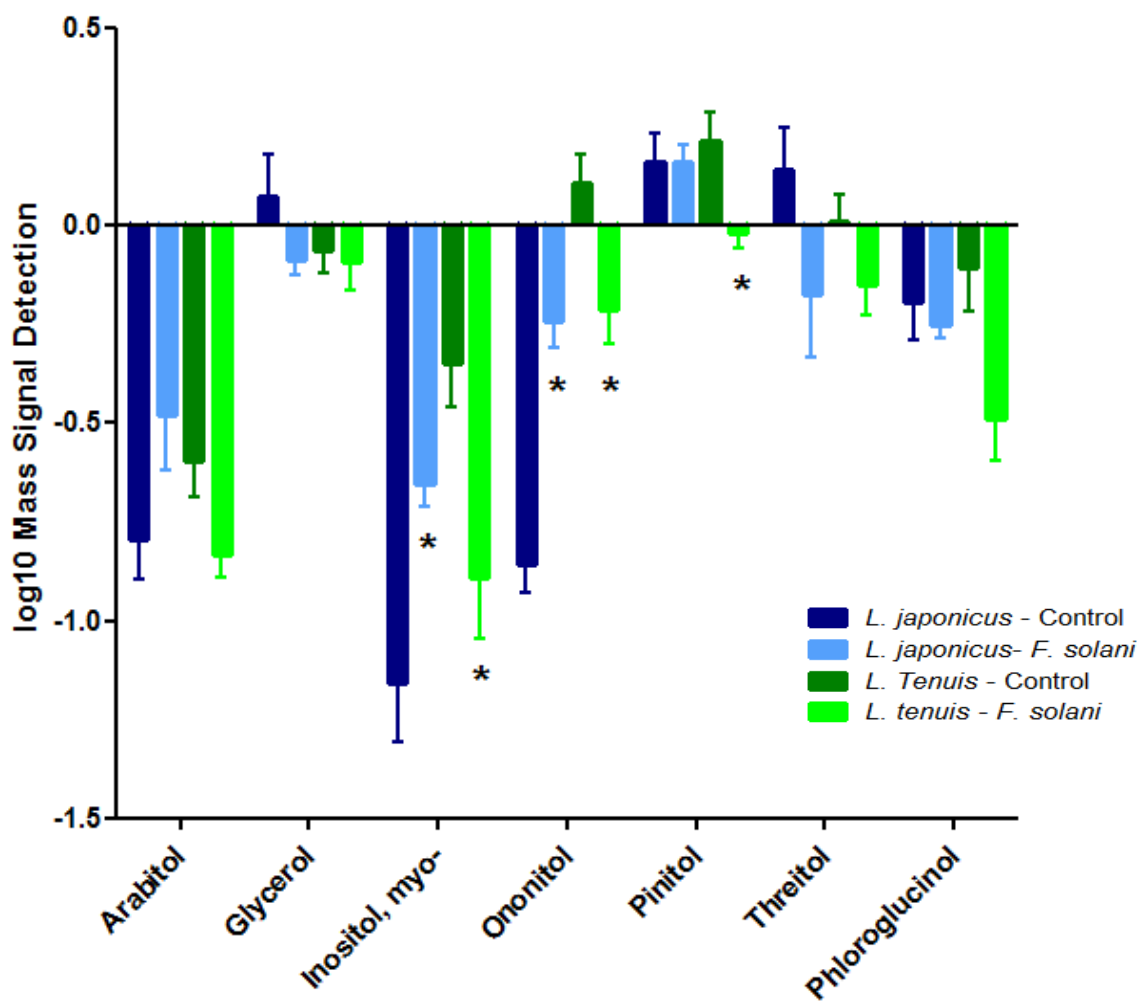


Figura N° 4.26. Polioles detectados en raíces mediante GC-IC/MS-TOF para cada tratamiento. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*.

* Diferencias estadísticamente significativas para T-Test comparando Control vs. *F. solani* (142L52B) para cada especie por separado ($p < 0.05$).



Debido a que la naturaleza de los órganos analizados (raíces y hojas) es diferente, se procedió a realizar el análisis comparativo entre especies y cada tratamiento por separado, para cada órgano analizado.

Por medio del PCA realizado en hojas para cada una de las especies se pudo observar que en el caso de *L. japonicus*, fue posible distinguir las muestras según los tratamientos “Control”, e “Inoculado” con *F. solani* (142L52B). No ocurrió lo mismo para las hojas de *L. tenuis*, donde no pudo observarse diferencia entre los tratamientos (Figura N° 4.27.a). Adicionalmente, también pudo determinarse que las muestras de hojas colectadas en plantas de ambas especies de *Lotus* en interacción con *F. solani* (142L52B) pueden agruparse por separado en base al Componente Principal 2 (PCA2). Un hecho a destacar es que las variables (metabolitos) que tienen mayor influencia sobre la variación en las hojas de plantas en interacción con *F. solani* (142L52B) difieren entre las especies hospedantes. Las hojas provenientes de *L. japonicus* están más influenciadas por los ácidos fosfórico, bórico, cinámico y fumárico y otros compuestos tales como el pinitol y myo-inositol. En cambio, las hojas de *L. tenuis* en plantas inoculadas con la cepa fúngica están influenciadas en mayor medida por las variaciones de los niveles de ácido benzoico y los aminoácidos glicina y serina (Figura N° 4.27.b)

En el caso de las raíces, el PCA permite la diferenciación entre las muestras de *L. japonicus* y *L. tenuis* para cada tratamiento, de acuerdo al componente principal 2 (PCA2). Asimismo, las muestras correspondientes a las raíces inoculadas de ambas especies de *Lotus*, difieren entre sí en cuanto a las variables que determinan la formación de los componentes principales (Figura N° 4.28.b). En el caso de *L. japonicus* inoculado con *F. solani* (142L52B), las variables que presentan la mayor fuente de variación fueron la fructosa y glucosa. En el caso de *L. tenuis* bajo idénticas condiciones experimentales, el ordenamiento indica que las raíces de esta especie están influenciadas por una disminución en los niveles de estos mismos azúcares (Figura N° 4.28.b)

Figura N° 4.27. Análisis de componentes principales basado en los metabolitos obtenidos mediante GC-IC/MS-TOF en las hojas analizadas de *L. japonicus* y *L. tenuis*, para los tratamientos “Control” y “*F. solani* (142L52B)”. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*. (Escala de colores de acuerdo a la contribución de cada variable al modelo expresada en porcentaje).

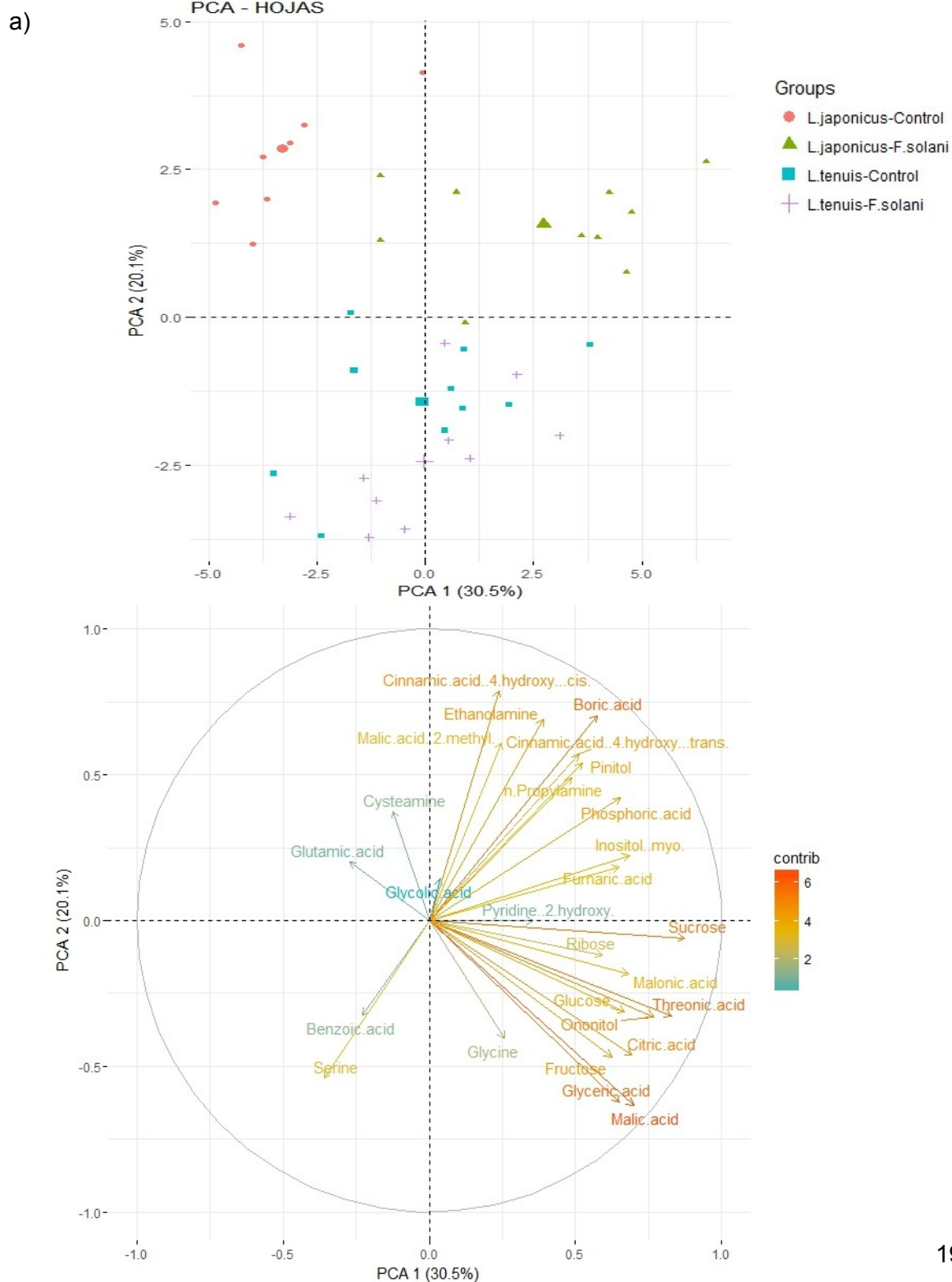
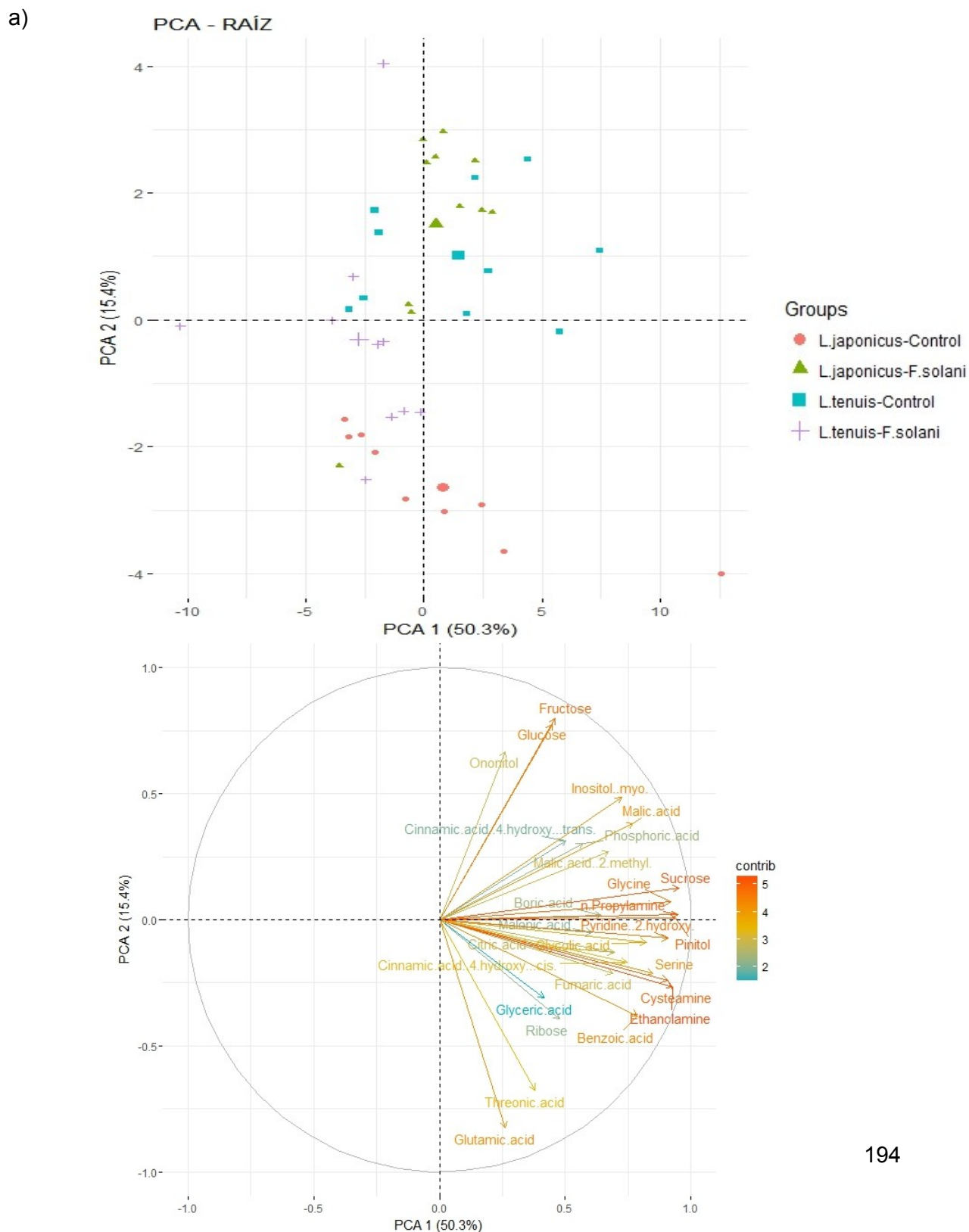


Figura N° 4.28. Análisis de componentes principales basado en los metabolitos obtenidos mediante GC-IC/MS-TOF en las raíces analizadas de *L. japonicus* y *L. tenuis* para los tratamientos “Control” y “*F. solani* (142L52B)”. Valores de respuesta a la señal de espectro de masas luego del análisis basado en *Mass Spectrum* y *Retention Time Index* mediante el software *TagFinder*. (Escala de colores de acuerdo a la contribución de cada variable al modelo expresada en porcentaje).



Discusión

Los ensayos realizados en esta tesis constituyen el primer estudio de la performance simbiótica de un hongo endofito de raíz, no micorrízico, en una planta modelo del género *Lotus*. Estudios similares a este tipo de interacción fueron realizados en otras especies vegetales, tales como las interacciones entre: *Oryza sativa* y *Fusarium spp.* (Fisher y Petrini, 1992; Naik y col, 2009), *Phialocephala fortini* y *Arabidopsis thaliana* (Sahay y Varma, 1999) diversos endofitos de raíz obtenidos de *Triticum aestivum* (Sieber y col., 1988) así como también la interacción entre *F. moniliforme* y *Zea mays* (Bacon y Hilton, 1996).

De acuerdo con la hipótesis planteada, sobre el potencial efecto benéfico sobre el *fitness* vegetal, pudimos verificar su cumplimiento para el caso del sistema de estudio *L. japonicus* – *F.solani*. No obstante, también pudimos comprobar que en el caso de *L. tenuis* – *F. solani* el efecto de la interacción no fue benéfico contradiciendo la misma.

Estimaciones morfológicas y fisiológicas. Posibles estimadores de la relación costo/beneficio de la interacción *Lotus spp.-Fusarium solani*

Como resultado de la caracterización de la interacción entre dos especies del género *Lotus* y un hongo endofito de raíz aislado de la especie *L. tenuis* creciendo en condiciones de salinidad y alcalinidad edáfica, identificado como *Fusarium solani* (142L52B), se evidenció un efecto diferencial en los hospedantes, en base a parámetros morfológicos y fotosintéticos. Nuestros resultados sugieren que la promoción del crecimiento observado en plantas de *L. japonicus* inoculadas con *F. solani* (142L52B), no obedece directamente a un mejoramiento de la actividad fotosintética por parte del hongo. Si bien la disminución significativa en la concentración de CO² en la cámara sub-estomática registrada en plantas de *L. japonicus* inoculadas (Figura N° 4.12), sugiere una mayor fijación del CO² (y por ende mayor fotosíntesis), es probable que dicha disminución obedeciera a una mayor dificultad para el ingreso del CO². Los resultados relacionados a una mayor eficiencia en la fijación de CO² coinciden con los obtenidos previamente por Obledo y colaboradores (2003), en el estudio del sistema *Agave victoria-reginae* - *F. oxysporum*, evidenciando un incremento en la eficiencia fotosintética, estimada con mediciones indirectas.

Por otra parte, la promoción del crecimiento pudo deberse a un mejor uso del agua en estas plantas (Figura N° 4.11). Estudios previos han demostrado que algunos hongos

endofitos pueden incrementar el *fitness* mediante un incremento en la EUA (Bacon y col., 1993; Elmi y col., 1995). Este incremento en la EUA podría estar a su vez directamente relacionado con la acumulación de ciertos azúcares y en especial de compuestos osmo-protectores como los polioles.

Los resultados sobre crecimiento de biomasa y fotosíntesis obtenidos en esta tesis, para la interacción entre *L. japonicus* – *F. solani* (142L52B), difieren de los resultados obtenidos por otros autores, que señalan que la simbiosis entre una leguminosa y un hongo que habita en la raíz, podría incrementar la tasa fotosintética, como consecuencia de los requerimientos carbonados del simbionte. Ejemplos de este tipo de estudios son los descritos para interacciones entre HMA y *Trifolium repens* (Wright y col., 1998), *Vicia faba* (Pang y Paul, 1980) y *Phaseolus vulgaris* (Mortimer y col., 2008). Asimismo, Spiering y colaboradores (2006), demostraron que la infección de plantas de *Lolium perenne* con *N. lotii*, determinó la disminución de la PN del hospedante. Estos ejemplos señalan que el incremento en la biomasa vegetal, como consecuencia de la infección con un hongo endofito, no siempre está directamente correlacionado con el incremento en la fotosíntesis (Spiering y col., 2006). Más aún, los efectos de la interacción son muy variables, debido a que el hongo puede producir compuestos tales como hormonas de crecimiento, como por ejemplo AIA (De Batista y col., 1990), y simultáneamente, enzimas invertasas (Lam y col., 1995) que podrían tener efectos directos sobre el crecimiento vegetal. Cabe señalar que existen reportes que demuestran que en la promoción del crecimiento vegetal inducido por un hongo de raíz, pueden estar relacionados muy diversos factores, entre los que podemos mencionar a la secreción de giberelinas (Kahn y col., 2009) o AIA (Waqas y col., 2012) por el endofito ó el mejoramiento de la nutrición fosforada (Gasoni y col., 1997; Maccheroni y Azevedo, 1998; Haselwandter y Read, 1982). Esto deja de manifiesto, que el efecto en el crecimiento puede ser justificado en base a más de un factor.

Los valores de Fv/Fm obtenidos fueron aproximadamente de 0.8, acordes con los valores óptimos descritos previamente para el género *Lotus* (Savé y col., 2000; Babuin y col., 2014). Esto indicaría, en primera instancia, que las plantas no presentaban un estrés que afectase al PSII, en ninguno de los tratamientos ensayados. Sin embargo, en *L. tenuis*, el Plabs disminuyó, lo cual sugiere que estas plantas se vieron negativamente afectadas por la presencia del hongo. Esta discordancia entre los resultados de Fv/Fm y Plabs en *L. tenuis* podría estar relacionada con el hecho de que éste último, es un parámetro “más sensible” que Fv/Fm (Živčák y col., 2009). Por otro lado, a partir de la disminución del

Plabs en plantas de *L. tenuis* inoculadas con *F. solani* (142L52B) se esperaría una menor PN. Sin embargo los resultados no avalan tal afirmación. Esta aparente incongruencia puede explicarse por el hecho de que el Plabs refleja únicamente la etapa fotoquímica de la fotosíntesis. Quizás la inclusión de nuevas evaluaciones complementarias (transcriptómica, bioquímicas, etc.) permitiría la mejor comprensión de los valores obtenidos.

Azúcares

A pesar de que la interacción con la cepa fúngica en ambas especies del género *Lotus* no permitió observar cambios en las tasas fotosintéticas sí fue posible observar diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de glucosa, fructosa y sacarosa cuantificados por GS-IC/MS-TOF. En *L. japonicus* un incremento en los niveles de glucosa y fructosa coinciden con estudios previos, en donde se evidenció el incremento en estos metabolitos, como consecuencia de la infección endofítica (Rasmussen y col., 2008). En el caso de *L. tenuis* inoculado con *F. solani* (142L52B), la disminución de los niveles de fructosa y sacarosa en hojas, analizado en conjunto con la acumulación de glucosa y fructosa en las raíces, podría indicar la posible utilización diferenciada de los compuestos carbonados simples por parte del endofito. Es importante destacar que la localización de *F. solani* es exclusiva en la región de las raíces, no evidenciándose infección de tipo sistémica en el resto de los tejidos.

Por otro lado, la disminución en los niveles de sacarosa en correspondencia con los incrementos observados para la glucosa y la fructosa, podrían estar relacionados con la degradación de la misma. Evidencia de este fenómeno se ha demostrado previamente en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum*, donde una acumulación de la enzima invertasa extracelular se correspondió con un incremento en los niveles de fructosa y glucosa transportados al apoplasto (Benhamou y col., 1991),.

Resulta interesante también el hecho de que en *L. japonicus* inoculado con *F. solani* (142L52B), se observó la acumulación de maltosa en hojas, lo podría estar indicando un incremento en la degradación del almidón para su uso en requerimientos metabólicos (Tetlow y col., 2004).

Por otra parte, estudios previos han demostrado que bajo estrés osmótico, *Festuca arundinacea* infectada con *Acremonium coenophialum* en condiciones de estrés hídrico, acumula glucosa y fructosa en las hojas de la vaina, lo que podría contribuir

significativamente al ajuste osmótico, (Richardson y col., 1992). Si bien, en el experimento realizado para caracterizar el sistema *Lotus spp-Fusarium solani*, no se incorporó el factor de estrés osmótico, debemos tener presente que se ha reportado previamente que diferentes especies de *Fusarium* producen síntomas relacionados a dicho estrés en *Cicer arietinum* (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985).

Aminoácidos

Los estudios realizados permitieron observar una disminución de los niveles de varios aminoácidos en las hojas de ambas especies y un aumento simultáneo de estos compuestos, en raíces, los cuales fueron inducidos por la inoculación con *F. solani* (Figura N° 4.15 y 4.16) lo que sugeriría una demanda “órgano específica” de los mismos.

Asimismo, es importante destacar el incremento en los niveles de GABA detectado en *L. japonicus* en respuesta a la inoculación con *F. solani* (142L52B), lo cual establece correspondencia con la disminución de los niveles de su precursor, el ácido glutámico (AG). Es menester recordar que la acumulación de GABA ha sido relacionada con la respuesta a diferentes estreses bióticos y abióticos en vegetales (Bown y Shelp, 1997; Shelp y col., 1999; Kinnersley y Turano, 2000, Tian y col., 2002; Bouche y Fromm, 2004). El AG y GABA son moléculas que tienen importancia en la “economía del C”, pudiendo producir ácido succínico, a partir de AG en condiciones estresantes que limitasen el normal funcionamiento del ciclo de Krebs (Shelp y col., 1999). Otras evidencias reportadas indican que AG y GABA se producen durante el almacenamiento y movilización de proteínas, como una forma de reciclar el N y C derivados de la arginina (Micallef y Shelp, 1989).

Fosfatos

En el caso de *L. japonicus* en interacción con *F. solani* (142L52B) se observó además, un aumento en los niveles de fosfatos en hoja, lo cual podría estar relacionado con el incremento del *fitness*, tal como fuera reportado para el caso de los endofitos septados dematiáceos (*Dark Septate Endophytes* -DSE-; Sieber y col., 2002; Rodriguez y col., 2009). Resulta un hecho reconocido, que un incremento en la nutrición fosforada aumenta los recursos necesarios para permitir un mayor crecimiento y acumulación de biomasa (Pang y col., 2010). Esta podría ser una de las razones que justifiquen el incremento del peso seco en vástago y raíces de *L. japonicus* observado en la interacción con la cepa fúngica. Además, también debemos tener en cuenta que el P es esencial para el

adecuado transporte de los azúcares, producidos desde el cloroplasto al citoplasma de las células del mesófilo (Taiz y Zeiger, 2010), lo que evidencia su importancia directa en el metabolismo del carbono (C) y el consiguiente efecto en los procesos relacionados con la obtención de energía.

La cepa de *F. solani* (142L52B) utilizada, ha demostrado previamente la capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico *in-vitro* (Capítulo 3). El efecto del incremento de ácido fosfórico también podría estar fundamentado en esta propiedad del microorganismo, lo que le permitiría movilizar eficientemente el nutriente. Por otro lado, teniendo en cuenta la dinámica del P en el suelo y su relación con la absorción del mismo por parte de las plantas en las formas de fosfato ácido y bi-ácido, el incremento de las concentraciones de ácidos orgánicos, podrían tener influencia en su movilización. En los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se observó un incremento de los ácidos málico y cítrico en las raíces de *L. japonicus* inoculado, en correspondencia con el incremento de los niveles de fosfato para el mismo hospedante. Estos resultados concuerdan con Jeffery y colaboradores (2017), quienes postulan que los incrementos de los ácidos málico y cítrico en el sistema radical tienen efecto directo en la mejora de la nutrición fosforada.

Ácidos orgánicos

El incremento en los niveles de algunos ácidos orgánicos en *L. japonicus* inoculado con la cepa *F. solani* (142L52B), coincide con los resultados demostrados previamente en el modelo simbiótico de *F. arundinacea* - *N. coenophialum*, donde se observó que los niveles de ácidos orgánicos secretados por las raíces de plantas inoculadas, era superior a aquellas que no presentaban la interacción con el endofito (Malinowski, 1998). Adicionalmente, también ha sido reportado que los incrementos de los niveles de ácidos orgánicos radiculares, (por ejemplo el ácido cítrico), están relacionados con la mejora en la adquisición del P (Jones, 1998).

También, en este trabajo se observó un incremento significativo en los niveles de los ácidos fumárico y málico en ambas especies cuando fueron inoculadas con *F. solani* (142L52B). Estos ácidos están relacionados directamente con su participación en la vía de los ácidos tricarboxílicos, por lo que tienen una importancia fundamental en los procesos relacionados a la obtención de energía. También es posible, que la acumulación de los ácidos málico y fumárico pueda deberse a la ocurrencia de reacciones

anapleróticas, como por ejemplo el ciclo del glioxilato, como vía alternativa para la obtención de energía (Mathews y col., 2003).

En síntesis, las variaciones en los niveles relativos de ácidos orgánicos, estarían relacionados con la obtención de energía, proceso que a su vez, se asociaría íntimamente con el costo de la interacción.

Fenilpropanoides

En este estudio, el compuesto representante mayoritario de los fenilpropanoides fue el ácido cinámico. La síntesis de dicho compuesto es mediada por la enzima fenil-alanina-amonía-liasa, (del inglés *phenylalanine ammonia-lyase*:PAL, Herman, 1995) sobre la fenilalanina (Lewis y Yamamoto, 1990). Diversos estudios han dejado en evidencia la importancia de los compuestos fenólicos en la respuesta de defensa de las plantas frente a diferentes estreses (Kauss y col., 1992; Dixon y col., 1995), incluyendo la respuesta sistémica adquirida (Rasmussen y col., 1991).

En este trabajo se demostró un incremento en los niveles foliares y radiculares de ácido cinámico en *L. japonicus* inoculado con *F. solani*. Estos resultados coinciden con los de Malinowski y colaboradores (1998), quienes registraron una acumulación de compuestos fenólicos en vástagos y raíces de plantas de *Festuca* en interacción con *N. coenophialum*, comparado con las plantas en ausencia del endofito. Los resultados obtenidos, también están en correspondencia con los de Abdel-Farid y colaboradores (2009), quienes observaron un incremento en los fenilpropanoides en plantas de *Brassicca rapa* inoculadas con *F. oxysporum*. Dichos autores atribuyen este incremento (junto con el de otros compuestos informados) a una respuesta relacionada con la defensa de la planta. Resultados opuestos fueron obtenidos de plantas de *L. tenuis* inoculadas con *F. solani* (142L52B), en las que se observó una disminución significativa de los niveles de ácido cinámico en raíces.

Observaciones similares se realizaron en estudios de infección de plantas de *Glicine max* y *Arabidopsis thaliana* con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* (Zabala y col., 2006; Hagemeyer y col. 2001) En base a la información bibliográfica consultada, podría plantearse como hipótesis que en el caso de *L. tenuis*, los fenilpropanoides podrían estar siendo utilizados en la producción de metabolitos secundarios. Alternativamente, podría suponerse que *L. tenuis* no ejerce el mecanismo de respuesta frente a la presencia de *F. solani*, mediante la acumulación de fenilpropanoides.

Polioles

Los polioles son metabolitos considerados “osmolitos compatibles”, es decir que pueden acumularse en grandes concentraciones pero no necesariamente interfieren directamente en el metabolismo celular. Además, poseen otros roles en la respuesta vegetal al estrés (Williamson y col., 2002). Otros trabajos previos, han reportado a los polioles como osmolitos característicos de los sistemas simbióticos (Bacon y col., 1993).

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron determinar un incremento en los niveles de polioles en plantas de *L. japonicus* inoculadas con *F. solani* (142L52B). Este resultado se encuentra en línea con los obtenidos previamente por Bacon (1993) para el sistema planta-endofito *Festuca arundinacea*-*Acremonium coenophialum*.

Los resultados presentados en esta tesis indican además, un incremento en los niveles de myo-inositol en raíces de *L. japonicus* inoculadas con *F. solani*. Este aumento está en correspondencia con los incrementos en los fosfatos y de biomasa registrados para esta especie, dado que el myo-inositol y sus derivados tienen una importancia directa en el balance homeostático del P y también están involucrados en la biogénesis de las membranas (Noiraud y col., 2001).

Es importante destacar que también, ha sido reportado previamente que hongos de los phylum: *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* y hongos imperfectos son capaces de producir polioles para ser utilizados como fuentes de carbohidratos solubles (Lewis y Smith, 1967). Esto denota la posible utilización de estos compuestos por parte del endofito.

Además, la acumulación de polioles está involucrada con la regulación de las relaciones hídricas de la planta (Morgan, 1984), así como también con el ajuste osmótico en las interacciones planta-endofitos bajo estrés hídrico, como por ejemplo en el modelo *Festuca-Neotyphodium* reportado previamente por West (1990).

La disminución de los niveles de myo-inositol, ononitol y pinitol en raíces de *L. tenuis* inoculadas con el endofito, indican una respuesta diferencial según la especie de *Lotus* que actúe como hospedante, pudiendo justificarse en el hecho reportado previamente por Jennings (1985) de que los polioles puedan ser utilizados por el endofito como sustratos carbonados.

Efectos de la interacción, según la especie hospedante

Los resultados obtenidos mediante el ordenamiento basado en un PCA, revelaron que el efecto de la interacción con *F. solani* fue más notorio en el caso de *L. japonicus*, comparado con *L. tenuis*. Adicionalmente pudo observarse que las muestras de ambas especies de *Lotus* inoculadas no se agrupaban en un mismo conjunto. Esto denota las diferencias en los efectos causados por la interacción con el hongo endofito en ambas especies hospedantes, lo que se traduce en variaciones significativas de las concentraciones de los metabolitos foliares.

Los efectos diferenciales obtenidos tanto en biomasa como en algunos metabolitos sugieren que, a pesar de que las especies ensayadas como hospedantes pertenecen al mismo género, poseen diferencias en el metabolismo primario, al menos durante el proceso de asociación con el hongo endofito.

Los resultados obtenidos en esta tesis coinciden con los lineamientos establecidos para la definición de las interacciones mutualistas, donde las modificaciones de las condiciones experimentales pueden provocar un cambio de una relación benéfica a un mutualismo menos beneficioso, e incluso a desencadenar una relación antagónica (West y col., 2007), como la que podría estar sucediendo en el bio-sistema *L. tenuis* - *F. solani*.

Estudios del campo de la ecología de la simbiosis, han manifestado diversas teorías basadas en el pasaje del mutualismo a la patogénesis en las relaciones planta-microorganismo. En este sentido, Saikkonen y colaboradores (1998), postularon que las interacciones entre plantas y hongos endofitos se ubican en un *continuum*, en el cual las posibilidades de interacción son amplias y no presentan puntos concretos o claros que definan una situación antagónica ó mutualista. Por otro lado, Bárbara Schulz propuso la hipótesis del “antagonismo balanceado” en el año 1999, para plantear la manera en la que la relación endofito-planta se mantiene balanceada, sin perjuicios para ninguno de los participantes y al mismo tiempo se sugirió, que los factores ambientales, juegan un papel fundamental en la estabilidad de la relación (Kusari y col., 2012). El abandono del mutualismo puede ocurrir cuando el costo excede al beneficio, implicando un perjuicio para uno de los participantes de la interacción. Este cambio del mutualismo a la patogénesis ocurre a escala evolutiva y podría incluso ser el factor responsable de la persistencia ó la pérdida de especies vegetales a largo plazo (Sachs y Simms, 2006).

Conclusión

Las interacciones entre hongos endofitos y las plantas superiores pueden abarcar un amplio rango de posibilidades que van desde el mutualismo a la patogénesis. La variación en el resultado de la interacción depende de diversos factores: el hospedante, el huésped y el ambiente que forma parte del contexto de la interacción entre ambos.

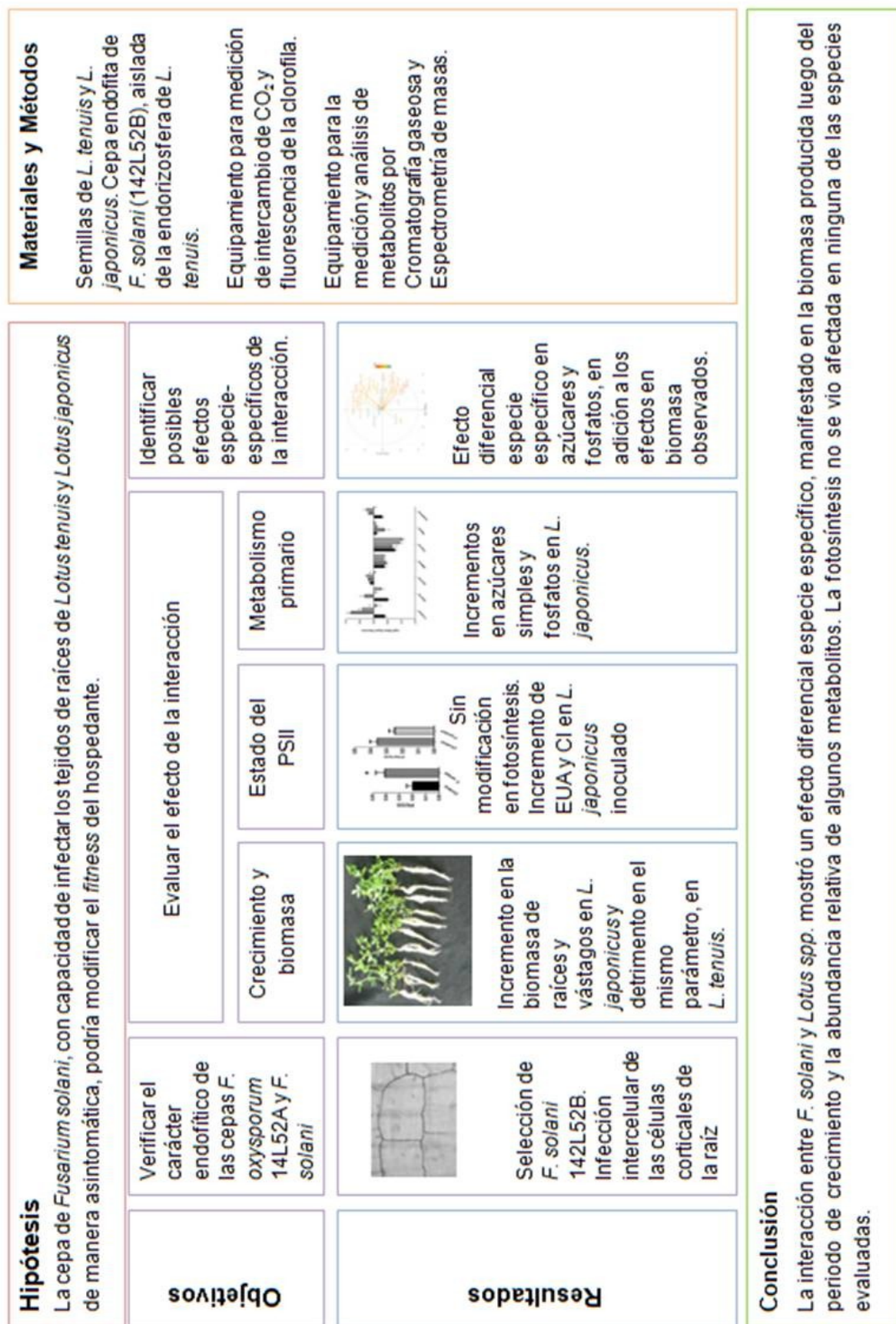
En el presente capítulo, se analizó el efecto de la variación del hospedante utilizando el bio-sistema *Lotus spp-Fusarium solani*. Este estudio, dejó en evidencia que, el efecto de la interacción resultante es contrastante para las diferentes especies evaluadas, independientemente de que ambas pertenezcan al mismo género.

También pudo demostrarse que el costo de la interacción debe ser evaluado por diversos métodos, para obtener una mejor caracterización del bio-sistema e intentar dilucidar las posibles razones por las cuales el resultado de la interacción varía según el hospedante.

Pueden plantearse diversas hipótesis acerca del motivo por el cual la interacción resulta benéfica en un caso y perjudicial en el otro, a pesar de que en ambos casos, no hay sintomatología evidente que permita calificar a la interacción *L. tenuis-F. solani* como una patogénesis. La respuesta metabólica de la interacción estuvo relacionada en varios aspectos con la respuesta vegetal característica al estrés osmótico y con los ciclos que involucran la obtención de energía, cuya incidencia no resulta clara ya que no pudieron observarse diferencias en la fotosíntesis neta entre las especies, a pesar del efecto contrastante observado en la acumulación de biomasa. Este resultado podría estar dejando en evidencia una incidencia también diferencial de la interacción planta-hongo en las diferentes vías metabólicas de transporte y utilización de los sustratos carbonados.

De los datos obtenidos se desprende la necesidad de utilizar técnicas complementarias complejas, como por ejemplo las herramientas transcriptómicas y diversas determinaciones bioquímicas, que permitan caracterizar e identificar con mayor precisión los procesos desencadenados como consecuencia de la interacción y su incidencia en el desarrollo de la promoción o inhibición del crecimiento vegetal.

Diagrama Resumen – Capítulo 4



Conclusión general

La expansión de la frontera agrícola ha llevado a que diversos ecosistemas fueran convertidos para ser utilizados con fines productivos. Sin embargo, la mayoría de los ambientes presentan alguna limitación para la producción de cultivos de interés agrícola. Estas limitaciones tienen como consecuencia la necesidad de la utilización de tecnologías y estrategias, que pueden tener impacto en los componentes del ecosistema.

La región de la Pampa Deprimida posee características edáficas limitantes para la producción de numerosos cultivos de importancia económica. Por este motivo, la actividad ganadera es una alternativa rentable frente a las restricciones impuestas por el ambiente y se ha convertido en la actividad productiva predominante de la región. A pesar de esto, la región de la Pampa Deprimida posee limitaciones para la producción ganadera, debido a que la flora nativa no presenta una buena aptitud forrajera. Es por esto que la conversión del pastizal natural dio lugar a praderas cultivadas de especies exóticas, por lo general de origen europeo.

La modificación de la flora nativa debida al reemplazo de la misma por especies exóticas, ha llevado a que sean necesarios aportes adicionales de insumos para lograr que la actividad sea exitosa. En las situaciones particulares en donde el ambiente es restrictivo, es indispensable contar además, con la presencia de especies vegetales que presenten adaptabilidad a las condiciones impuestas por el ambiente circundante, como es el caso de *L. tenuis*. La combinación de estrategias de manejo sobre parte del ecosistema puede tener repercusiones sobre los seres vivos que habitan en el mismo, tanto por la utilización de sustancias de síntesis química como por el cambio en la composición florística. El estudio realizado en el presente trabajo de tesis deja en manifiesto el efecto no significativo de la conversión del pastizal nativo sobre el componente bacteriano del ecosistema. Podría considerarse que la actividad realizada en forma continua es una práctica sustentable, ya que no altera la estructura de la comunidad bacteriana de los suelos, o bien, ésta practica no representa un impacto lo suficientemente significativo para generar la modificación de dicha comunidad. En cambio, la comunidad de hongos que habita el ambiente edáfico se modificó bajo el efecto de *L. tenuis*, con un aumento de la diversidad de organismos fúngicos, siendo éste componente del ecosistema más sensible a los cambios producidos por la conversión de la composición florística.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis constituyen el primer análisis de caracterización de la comunidad bacteriana y fúngica de los suelos de la Pampa Deprimida, siendo punto de partida para análisis posteriores relacionados a la

funcionalidad de la comunidad dentro del ecosistema, que permitirán comprender cuáles son los procesos característicos llevados a cabo por los representantes de la microbiota que habita el ambiente edáfico. Asimismo se establecieron en el estudio las variables que tienen importancia en la distribución de los organismos fúngicos en los suelos de la Pampa Deprimida.

Las restricciones presentes en el ambiente del suelo y su variabilidad espacial permiten suponer la ocurrencia de procesos de selección de organismos a través del tiempo. La introducción de *L. tenuis* pudo generar procesos de sucesión ecológica en los organismos asociados al suelo, dando lugar a características distintivas relacionadas a la adaptabilidad. Entre los factores edáficos determinantes de la distribución de la comunidad, se destacaron el pH y el Fósforo disponible. Estos factores también estuvieron relacionados con los organismos endorizosféricos, siendo los aislamientos obtenidos de la endorizosfera de *L. tenuis*, los que presentaron la mayor capacidad solubilizadora de fosfato. La capacidad de solubilizar fosfato de manera *in-vitro* por parte de todas las cepas fúngicas endorizosféricas aisladas, pone de manifiesto una capacidad que podría resultar interesante, desde un punto de vista estratégico-productivo, dadas las falencias en la disponibilidad de este nutriente en los suelos alcalinos. La posible utilización de organismos fúngicos simbioses (no micorrizicos) solubilizadores de fosfato, que además toleran condiciones de salinidad y alcalinidad, podría ser beneficiosa en el ámbito productivo. Sin embargo, la aplicación de este tipo de organismos requiere de una evaluación exhaustiva de los efectos que pudiesen causar en el hospedante ó en el resto de los seres vivos que forman parte del ecosistema. Como se observó en el capítulo 4, los efectos resultantes de la interacción entre *Lotus spp.* y una cepa de *Fusarium solani*, resultaron en un beneficio para *L. japonicus*, pero con efectos perjudiciales para *L. tenuis*. Esto reafirma varias hipótesis planteadas en la bibliografía que indican que las interacciones entre las plantas superiores y hongos endofitos son altamente variables y forman parte de un *continuum* que varía desde el mutualismo hasta la patogénesis, pasando por situaciones en donde es difícil definir una interacción como benéfica o perjudicial. Por otro lado, la evidencia demostrada en este trabajo de tesis pone de manifiesto la posibilidad de que organismos conocidos mayormente como patógenos de cultivos, puedan tener efectos de promoción de crecimiento. Estas características requieren que las herramientas utilizadas en la evaluación de los efectos de las interacciones, brinden información acerca de diversos aspectos fisiológicos que indiquen el estado del hospedante de manera completa.

Los resultados obtenidos en el Capítulo 4, demostraron la necesidad de realizar los estudios de caracterización de las interacciones desde diferentes aspectos, no sólo mediante la evaluación de parámetros relacionados a la morfología y a la actividad fotosintética, ya que la ausencia de diferencias en las tasas fotosintéticas entre las plantas control e inoculadas, no implicó necesariamente la ausencia de modificaciones en los metabolitos relacionados a la fotosíntesis. Este es un indicio de que la caracterización de la interacción no puede ser evaluada exclusivamente por parámetros fotosintéticos, sino que son necesarios análisis complementarios que permitan explicar la modificación del *fitness*. En este trabajo de tesis, se incorpora el primer estudio metabolómico resultante de la interacción entre la especie modelo *L. japonicus* y un simbionte fúngico del género *Fusarium*, lo que plantea nuevas líneas de investigación relacionadas con los efectos particulares de la presencia del hongo en las raíces del hospedante, que expliquen la ocurrencia de mecanismos específicos, tanto de respuesta a la infección como de aportes nutricionales del simbionte a la leguminosa. Este antecedente constituye un aporte en el conocimiento acerca de las interacciones entre plantas y hongos del género *Fusarium*, que no desencadenan necesariamente una patogénesis.

Bibliografía

Abarenkov, K. et al., 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186(2), pp.281–285.

Abdel-Farid, I. B., Jahangir, M., van den Hondel, C. A. M. J. J., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2009). Fungal infection-induced metabolites in *Brassica rapa*. *Plant Science*, 176(5), 608-615.

Adams JE (1921) Observation on wheat scab in Pennsylvania and its pathological histology. *Phytopathology* 11:115–124.

Adler, L. et al., 1985. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of bacteriology*, vol. 162, no 1, p. 300-306.

Ahlholm, J. U., Helander, M., Lehtimäki, S., Wäli, P., & Saikkonen, K. (2002). Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. *Oikos*, 99(1), 173-183.

Albarracín Orio, A.G., Brücher, E. & Ducasse, D. a., 2016. Switching between monocot and dicot crops in rotation schemes of Argentinean productive fields results in an increment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity. *Applied Soil Ecology*, 98, pp.121–131.

Alexander, M. (1984). Ecology of rhizobium. In *Biological Nitrogen Fixation* (pp. 39-50). Springer, Boston, MA

Aono, R., 1990. Taxonomic Distribution of Alkali-tolerant Yeasts. *Systematic and applied microbiology*, 13(4), pp.394–397.

Allwood, J. W., Erban, A., de Koning, S., Dunn, W. B., Luedemann, A., Lommen, A., ... & Goodacre, R. (2009). Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography–electron impact–time of flight mass spectrometry (GC–EI–TOF/MS) based plant metabolomics. *Metabolomics*, 5(4), 479-496.

Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.

Arnold, A. E. (2008). Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology. *Tropical forest community ecology*, 178-188.

Aziz, I., & Khan, M. A. (2001). Experimental assessment of salinity tolerance of *Ceriops tagal* seedlings and saplings from the Indus delta, Pakistan. *Aquatic Botany*, 70(3), 259-268.

Babuín, M. F., Campestre, M. P., Rocco, R., Bordenave, C. D., Escaray, F. J., Antonelli, C., ... & Ruiz, O. A. (2014). Response to long-term NaHCO₃-derived alkalinity in model *Lotus japonicus* Ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20: transcriptomic profiling and physiological characterization. *PloS one*, 9(5), e97106.

Backhouse, D., Burgess, L. W., & Summerell, B. A. (2001). Biogeography of *Fusarium*. In *Fusarium. Paul E. Nelson Memorial symposium. APS Press, Bethesda* (pp. 122-137).

Bacon, C.W. & Hinton, D.M., 1996. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Canadian Journal of Botany*, 74(8), pp.1195–1202. Available at: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/b96-144>.

Bacon, C.W., 1993. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 44(1–4), pp.123–141.

Bailleres, M. & Sarena, D., 2009. Promoción de *Lotus tenuis* Chacra Experimental Integrada de Chascomús. , p.7.

Baltruschat, H. et al., 2008. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. , pp.501–510.

Barns, S. M., Takala, S. L., & Kuske, C. R. (1999). Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. *Applied and environmental microbiology*, 65(4), 1731-1737.

Barns, S.M. et al., 2007. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), pp.3113–3116.

Barriuso, J., Marín, S., & Mellado, R. P. (2010). Effect of the herbicide glyphosate on glyphosate-tolerant maize rhizobacterial communities: a comparison with pre-emergency applied herbicide consisting of a combination of acetochlor and terbutylazine. *Environmental microbiology*, 12(4), 1021-1030.

- Barrow, J. R., & Osuna, P. (2002). Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *Journal of Arid Environments*, 51(3), 449-459.
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., & de-Bashan, L. E. (2013). A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biology and fertility of soils*, 1-2.
- Batista, W. B., Taboada, M. A., Lavado, R. S., Perelman, S. B., & León, R. J. (2005). Asociación entre comunidades vegetales y suelos en el pastizal de la Pampa Deprimida. *La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas. Un homenaje a Rolando León. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires*, 113-129.
- Batista, W. B. (1991). Correspondencia entre comunidades vegetales y factores edáficos en el pastizal de la Pampa Deprimida. *Master's thesis. Universidad de Buenos Aires, Argentina[Links]*.
- Bauer, M. et al., 2004. Archaea-like genes for C1-transfer enzymes in Planctomycetes: Phylogenetic implications of their unexpected presence in this phylum. *Journal of Molecular Evolution*, 59(5), pp.571–586.
- Behera, B. C., Singdevsachan, S. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 97-110.
- Belesky, D. P., Devine, O. J., & Pallas, J. E. (1987). Photosynthetic activity of tall fescue as influenced by a fungal endophyte. *Photosynthetica*.
- Belesky, D. P. (1999). Lotus species used in reclamation, renovation, and revegetation. *Trefoil: The science and technology of Lotus*, (trefoilthescien), 133-143.
- Benhamou, N., Grenier, J., & Asselin, A. (1991). Immunogold localization of pathogenesis-related protein P14 in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 38(4), 237-253.
- Berger, S., Sinha, A.K. & Roitsch, T., 2007. Plant physiology meets phytopathology: Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 58(15–16), pp.4019–4026.

- Bergmann, G.T. et al., 2011. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(7), pp.1450–1455. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.03.012>.
- Blumenthal, M. J., & McGraw, R. L. (1999). Lotus adaptation, use, and management. *Trefoil: the science and technology of Lotus*, (trefoiltheskien), 97-119.
- Bolan, N. S. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and soil*, 134(2), 189-207
- Bonfante, P., & Perotto, S. (1995). Tansley Review No. 82. *New Phytologist*, 130(1), 3-21.
- Booth, C. (1971). The genus fusarium. The genus Fusarium.
- Bordenave, C. D., Escaray, F. J., Menendez, A. B., Serna, E., Carrasco, P., Ruiz, O. A., & Gárriz, A. (2013). Defense responses in two ecotypes of Lotus japonicus against non-pathogenic Pseudomonas syringae. *PLoS One*, 8(12), e83199.
- Bouche, N., & Fromm, H. (2004). GABA in plants: just a metabolite?. *Trends in plant science*, 9(3), 110-115.
- Boshoff, W. H. P., Swart, W. J., Pretorius, Z. A., Liebenberg, M. M., & Crous, P. W. (1996). Isozyme variability among isolates of Phaeoisariopsis griseola in southern Africa. *Plant Pathology*, 45(2), 344-349
- Bown, A. W., & Shelp, B. J. (1997). The Metabolism and Functions of [gamma]-Aminobutyric Acid. *Plant Physiology*, 115(1), 1.
- Branco, R., Chung, A. P., Veríssimo, A., & Morais, P. V. (2005). Impact of chromium-contaminated wastewaters on the microbial community of a river. *FEMS microbiology ecology*, 54(1), 35-46.
- Bray, R. H., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil science*, 59(1), 39-46.
- Bremner, J. M. (1965). Total Nitrogen 1. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*, (methodsofsoilanb), 1149-1178.
- Bridge, P. & Spooner, B., 2001. Soil fungi diversity and detection.pdf. *Plant and Soil*, 232(1), pp.147–154.

- Broeckling, C. D., Huhman, D. V., Farag, M. A., Smith, J. T., May, G. D., Mendes, P., ... & Sumner, L. W. (2004). Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of experimental botany*, 56(410), 323-336
- Bronstein, J. L., Alarcón, R., & Geber, M. (2006). The evolution of plant–insect mutualisms. *New Phytologist*, 172(3), 412-428.
- Buckley, D. H., & Schmidt, T. M. (2001). Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. *FEMS microbiology ecology*, 35(1), 105-112.
- Buckley, D.H. & Schmidt, T.M., 2001. Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, pp.105–112.
- Buckley, D.H. & Schmidt, T.M., 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, 5(6), pp.441–452.
- Buckley, D.H. et al., 2006. Diversity of Planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), pp.4522–4531.
- Burkart, M., James, D., Liebman, M., & Herndl, C. (2005). Impacts of integrated crop-livestock systems on nitrogen dynamics and soil erosion in western Iowa watersheds. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 110(G1).
- Burkholder, P. R. (1952). Cooperation and conflict among primitive organisms. *American Scientist*, 40(4), 600-631.
- Bush, L. P., Wilkinson, H. H., & Schardl, C. L. (1997). Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant physiology*, 114(1), 1.
- Butinar, L., Strmole, T., & Gunde-Cimerman, N. (2011). Relative incidence of ascomycetous yeasts in arctic coastal environments. *Microbial ecology*, 61(4), 832-843.
- Cassan, F., Maiale, S., Masciarelli, O., Vidal, A., Luna, V., & Ruiz, O. (2009). Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European journal of soil biology*, 45(1), 12-19.

Castagno, L. N., Estrella, M. J., Sannazzaro, A. I., Grassano, A. E., & Ruiz, O. A. (2011). Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea ecalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *Journal of applied microbiology*, 110(5), 1151-1165.

Caporaso, J.G. et al., 2010. correspondence QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. Nature Publishing Group, 7(5), pp.335–336. Available at:

Castro Jr, J. V., Peralba, M. C., & Ayub, M. A. (2007). Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42(8), 883-886

Carter, J. P., Rezanoor, H. N., Desjardins, A. E., & Nicholson, P. (2000). Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. *Plant Pathology*, 49(4), 452-460.

Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69(1), 2-9

Chapman, H. D. (1965). Cation-exchange capacity 1. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*, (methodsofsoilanb), 891-901.

Chase, J. M., Biro, E. G., Ryberg, W. A., & Smith, K. G. (2009). Predators temper the relative importance of stochastic processes in the assembly of prey metacommunities. *Ecology letters*, 12(11), 1210-1218.

Chia, D.W. et al., 2000. Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in Arabidopsis and other plant species. *Planta*, 211, pp.743–751.

Chin, K.-J., Liesack, W. & Janssen, P.H., 2001. *Opitutus terrae* gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division 'Verrucomicrobia' isolated from rice paddy soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), pp.1965–1968.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J.K. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 2005, vol. 45, no 2, p. 437-448.

Chistoserdova, L., Jenkins, C., Kalyuzhnaya, M. G., Marx, C. J., Lapidus, A., Vorholt, J. A., ... & Lidstrom, M. E. (2004). The enigmatic planctomycetes may hold a key to the origins of methanogenesis and methylotrophy. *Molecular biology and evolution*, 21(7), 1234-1241.

Chou, H.-M. et al., 2000. Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Molecular Plant Pathology*, 1(2), pp.99–113.

Clay, K. (1988). Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, 69(1), 10-16.

Colpaert, J. V et al., 1997. The use of inositol hexaphosphate as a phosphorus source by mycorrhizal and non-mycorrhizal Scots Pine (*Pinus sylvestris*). , 2, pp.407–415.

Correll, J. C., Gordon, T. R., & McCain, A. H. (1992). Genetic diversity in California and Florida populations of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *Phytopathology*, 82(4), 415-420

Cuomo, C. A., Güldener, U., Xu, J. R., Trail, F., Turgeon, B. G., Di Pietro, A., ... & Adam, G. (2007). The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 317(5843), 1400-1402.

da Rocha, U.N. et al., 2010. Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the Verrucomicrobia subdivision 1 from the potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere. *Journal of Soils and Sediments*, 10(2), pp.326–339.

De Bary, A. (1879). *Die erscheinung der symbiose*. Verlag von Karl J. Trübner.

De Battista, J. P., Bacon, C. W., Severson, R., Plattner, R. D., & Bouton, J. H. (1990). Indole acetic acid production by the fungal endophyte of tall fescue. *Agronomy Journal*, 82(5), 878-880.

Degtjareva, G. V., Kramina, T. E., Sokoloff, D. D., Samigullin, T. H., Sandral, G., & Valiejo-Roman, C. M. (2008). New data on nrITS phylogeny of *Lotus* (Leguminosae, Loteae). *Wulfenia*, 15, 35-49.

Derakshani, M., Lukow, T. & Liesack, W., 2001. Novel Bacterial Lineages at the (Sub) Division Level as Detected by Signature Nucleotide-Targeted Recovery of 16S rRNA

Genes from Bulk Soil and Rice Roots of Flooded Rice Microcosms Novel Bacterial Lineages at the (Sub) Division Level as Detected by S. , 67(2), pp.623–631.

DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., ... & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 5069-5072.

Deubel, A., Gransee, A. & Merbach, W., 2000. Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. , pp.387–392.

Díaz, P., Borsani, O., & Monza, J. (2005). Lotus-related species and their agronomic importance. In *Lotus japonicus handbook*(pp. 25-37). Springer, Dordrecht.

Dick, R.P., 1992. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 40(1–4), pp.25–36.

Dighton, J. (1983). Phosphatase production by mycorrhizal fungi. *Plant and soil*, 71(1-3), 455-462.

Di Menna, M. E. (1959). Some physiological characters of yeasts from soils and allied habitats. *Microbiology*, 20(1), 13-23.

Dixon, R.A. & Paiva, N.L., 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), p.1085. Available at: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/3870059?origin=crossref>.

Douglas, A. E. (2010). *The symbiotic habit*. Princeton University Press.

Druille, M., Cabello, M.N., et al., 2013. Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 64, pp.99–103. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.007>.

Druille, M., Omacini, M., et al., 2013a. Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate application. *Applied Soil Ecology*, 72, pp.143–149.

Doran, J. W., & Parkin, T. B. (1994). Defining and assessing soil quality. *Defining soil quality for a sustainable environment*, (definingsoilqua), 1-21.

Domsch, K. H., Jagnow, G., & Anderson, T. H. (1983). An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. In *Residue Reviews* (pp. 65-105). Springer, New York, NY.

Dunbar, J. et al., 1999. Levels of Bacterial Community Diversity in Four Arid Soils Compared by Cultivation and 16S rRNA Gene Cloning. , 65(4), pp.1662–1669.

Dunbar, J. et al., 2002. Empirical and Theoretical Bacterial Diversity in Four Arizona Soils. *Applied and environmental microbiology*, 68(6), pp.3035–3045. Available at: <http://aem.asm.org/content/68/6/3035.short>.

Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Davis, J. A., & Kuske, C. R. (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1662-1669.

Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), pp.2460–2461.

Elmi, A. A., & West, C. P. (1995). Endophyte infection effects on stomatal conductance, osmotic adjustment and drought recovery of tall fescue. *New Phytologist*, 131(1), 61-67.

Entio, L.J. & Mujica, M. de la M., 2011. Resiembra natural en *Lotus tenuis* implantado con diferentes sistemas de siembra. *Agrociencia*, 45(4), pp.431–441.

Escaray, F. J., Menendez, A. B., Gárriz, A., Pieckenstain, F. L., Estrella, M. J., Castagno, L. N., ... & Ruiz, O. A. (2012). Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Science*, 182, 121-133.

Escaray, F. J., Rosique, F. J. C., Scambato, A. A., Bilenca, D., Carrasco, P., Matarredona, A. V., ... & Menéndez, A. B. (2010). Evaluation of a technical revegetation action performed on foredunes at Devesa de la Albufera, Valencia, Spain. *Land Degradation & Development*, 21(3), 239-247

Escudero, V., & Mendoza, R. (2005). Seasonal variation of arbuscular mycorrhizal fungi in temperate grasslands along a wide hydrologic gradient. *Mycorrhiza*, 15(4), 291-299.

Etchevehere, P. (1961). Bosquejo de regiones geomorfológicas y de drenaje de la República Argentina. *IDIA*, 162, 7-25.

Estrella, M. J., Munoz, S., Soto, M. J., Ruiz, O., & Sanjuán, J. (2009). Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and environmental microbiology*, 75(4), 1088-1098.

Feld, L. et al., 2015. Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by amoA expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS ONE*, 10(5), pp.1–20.

Fernández, F. G., & Hoesft, R. G. (2009). Managing soil pH and crop nutrients. *Illinois agronomy handbook*, 91-112.

Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature biotechnology*, 18(11), 1157.

Fierer, N. et al., 2013. Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States. *Science*, 342(6158), pp.621–624.

Fisher, P. J., & Petrini, O. (1992). Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist*, 120(1), 137-143.

Fuerst, J. A. (1995). The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology*, 141(7), 1493-1506.

Gardes, M., Bruns, T.D. & Pathology, P., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. , pp.113–118.

Gasoni, L., & De Gurfinkel, B. S. (1997). The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. *Mycological Research*, 101(7), 867-870.

George, T.S. et al., 2007. Differential interaction of *Aspergillus niger* and *Peniophora lycii* phytases with soil particles affects the hydrolysis of inositol phosphates. , 39, pp.793–803.

Goldmann, K., Schröter, K., Pena, R., Schöning, I., Schrumpf, M., Buscot, F., ... & Wubet, T. (2016). Divergent habitat filtering of root and soil fungal communities in temperate beech forests. *Scientific reports*, 6, 31439.

Gondo, T., Sato, S., Okumura, K., Tabata, S., Akashi, R., & Isobe, S. (2007). Quantitative trait locus analysis of multiple agronomic traits in the model legume *Lotus japonicus*. *Genome*, 50(7), 627-637

Gordon, W. L. (1952). The occurrence of *Fusarium* species in Canada: II. Prevalence and taxonomy of *Fusarium* species in cereal seed. *Canadian Journal of Botany*, 30(2), 209-251.

Grum-Grzhimaylo, A.A. et al., 2016. On the diversity of fungi from soda soils. *Fungal Diversity*, 76(1), pp.27–74.

Grum-Grzhimaylo, A.A., et al., 2013. *Sodiomyces alkalinus*, a new holomorphic alkaliphilic ascomycete within the Plectosphaerellaceae. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, vol. 31, p. 147.

Gundel, P.E. et al., 2008. Neotyphodium endophyte infection frequency in annual grass populations: relative importance of mutualism and transmission efficiency. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1637), pp.897–905. Available at: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2007.1494>.

Gundel, P.E. et al., 2009. Imperfect vertical transmission of the endophyte neotyphodium in exotic grasses in grasslands of the flooding pampa. *Microbial Ecology*, 57(4), pp.740–748.

Gupta, R., SINGAL, R., SHANKAR, A., KUHAD, R. C., & SAXENA, R. K. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40(3), 255-260

Haapalainen, M. et al., 2016. *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* associated with basal rot of onion in Finland. *Plant Pathology*, 65(8), pp.1310–1320.

Hagemeyer, J., Schneider, B., Oldham, N.J., Hahlbrock, K., 2001. Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 753–758.

Hallmann, J., & Sikora, R. A. (1994). Influence of *Fusarium oxysporum*, a mutualistic fungal endophyte, on *Meloidogyne incognita* infection of tomato/Einfluß von *Fusarium*

oxysporum, einem Endophyten mit mutualistischer Wirkung, auf den Befall von Tomaten durch *Meloidogyne incognita*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 475-48

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Paleontological statistics software: package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, (4).

Haselwandter, K., & Read, D. J. (1982). The significance of a root-fungus association in two *Carex* species of high-alpine plant communities. *Oecologia*, 53(3), 352-354.

Hassan, H. A. H. (2002). Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. *Rostlinna vyroba*, 48(3), 101-106.

Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological research*, 95(6), 641-655.

Hedlund, B.P., Gosink, J.J. & Staley, J.T., 1997. Verrucomicrobia div . nov ., a new division of the Bacteria containing three new species of Prostheco bacter. , pp.29–38.

Hodgson, S. et al., 2014. Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and Evolution*, 4(8), pp.1199–1208.

Hooper, D. U., & Vitousek, P. M. (1997). The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. *Science*, 277(5330), 1302-1305.

Hugenholtz, P., Goebel, B.M. & Pace, N.R., 1998. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, v(18), p.180p4765-4774.

Illmer, P. & Schinner, F., SOLUBILIZATION OF INORGANIC CALCIUM MECHANISMS.

Ingledeu, W.J., 1990. Acidophiles. *Microbiology of extreme environments*, 33-54.

Imazaki, I., & Kadota, I. (2015). Molecular phylogeny and diversity of *Fusarium* endophytes isolated from tomato stems. *FEMS microbiology ecology*, 91(9), fiv098.

Jang, J.C. & Sheen, J., 1994. Sugar Sensing in Higher-Plants. *Plant Cell*, 6(11), pp.1665–1679.

Janssen, P. H. (1998). Pathway of glucose catabolism by strain VeGlc2, an anaerobe belonging to the Verrucomicrobiales lineage of bacterial descent. *Applied and environmental microbiology*, 64(12), 4830-4833.

Janssen, P. H., Schuhmann, A., Mörschel, E., & Rainey, F. A. (1997). Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the Verrucomicrobiales lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4), 1382-1388.

Janssen, P.H. & Frenzel, P., 1997. Inhibition of methanogenesis by methyl-fluoride - studies of pure and defined mixed cultures of anaerobic-bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(N11), pp.4552–4557.

Janssen, P.H., 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes MINIREVIEWS Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), pp.1719–1728.

Jeffery, R.P. et al., 2017. Root morphology acclimation to phosphorus supply by six cultivars of *Trifolium subterraneum* L. *Plant and Soil*, 412(1–2), pp.21–34.

Jennings, D. H. (1985). Polyol metabolism in fungi. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 25, pp. 149-193). Academic Press.

Jesus, E. da C. et al., 2016. Influence of corn, switchgrass, and prairie cropping systems on soil microbial communities in the upper Midwest of the United States. *GCB Bioenergy*, 8(2), pp.481–494.

Jogawat, A. et al., 2016. PiHOG1 , a stress regulator MAP kinase from the root endophyte fungus *Piriformospora indica* , confers salinity stress tolerance in rice plants. *Nature Publishing Group*, (October), pp.1–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep36765>.

Johnson, N.C., Graham, J.H. & Smith, F.A., 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism – parasitism continuum *. *New Phytologist*, (135), pp.575–585.

Jones, D. L. (1998). Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant and soil*, 205(1), 25-44.

- Joseph, S. J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C. A., & Janssen, P. H. (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7210-7215.
- Jumpponen, A. R. I., & Trappe, J. M. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *The New Phytologist*, 140(2), 295-310.
- Jurgens, G. & Saano, A., 1999. Diversity of soil Archaea in boreal forest before, and after clear-cutting and prescribed burning. *FEMS Microbiology Ecology*, 29(2), pp.205–213.
- Kalyuzhnaya, M.G. et al., 2005. Analysis of Gene Islands Involved in Methanopterin-Linked C 1 Transfer Reactions Reveals New Functions and Provides Evolutionary Insights. *Journal of Bacteriology*, 187(13), pp.4607–4614.
- Kalyuzhnaya, M.G. et al., 2005. Development and application of polymerase chain reaction primers based on fhcD for environmental detection of methanopterin-linked C1-metabolism in bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(8), pp.1269–1274.
- Kang, Z., & Buchenauer, H. (1999). Immunocytochemical localization of Fusarium toxins in infected wheat spikes by Fusarium culmorum. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(5), 275-288.
- Katan, J. (1971). Symptomless carriers of the tomato Fusarium wilt pathogen. *Phytopathology*, 61(10), 1213-1217.
- Kaschuk, G. et al., 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6), pp.1233–1244. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.005>.
- Kauss, H., Krause, K. & Jeblick, W., 1992. Methyl jasmonate conditions parsley suspension cells for increased elicitation of phenylpropanoid defense responses.
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., & Papadopoulou, K. K. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic Fusarium solani strain. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3853-3864.

Khan, M. A., & Weber, D. J. (Eds.). (2006). *Ecophysiology of high salinity tolerant plants* (Vol. 40). Springer Science & Business Media.

Khan, S. A., Hamayun, M., Kim, H. Y., Yoon, H. J., Seo, J. C., Choo, Y. S., ... & Kim, J. G. (2009). A new strain of *Arthrinium phaeospermum* isolated from *Carex kobomugi* Ohwi is capable of gibberellin production. *Biotechnology letters*, 31(2), 283-287.

Kehui, O. & Kun, W., 2007. Establishment of sown pastures in the hilly red soil region of the subtropics in southern China. , 41, pp.92–99.

Kellogg, C.A., Goldsmith, D.B. & Gray, M.A., 2017. Biogeographic comparison of *Lophelia*-associated bacterial communities in the western atlantic reveals conserved core microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), pp.1–15.

Kibblewhite, M.G. et al., 2008. Soil health in agricultural systems. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1492), pp.685–701.

Available

at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2610104&tool=pmcentrez&rend>

Kirkbride, J. H. (1999). Lotus systematics and distribution. *Trefoil: The science and technology of Lotus*, (trefoiltheskien), 1-20.ertype=abstract.

Kinnersley, A. M., & Turano, F. J. (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(6), 479-509.

Koide, R., & Elliott, G. (1989). Cost, benefit and efficiency of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis.

Koshino, H., Terada, S. I., Yoshihara, T., Sakamura, S., Shimanuki, T., Sato, T., & Tajimi, A. (1988). Three phenolic acid derivatives from stromata of *Epichloe typhina* on *Phleum pratense*. *Phytochemistry*, 27(5), 1333-1338.

Kowalchuk, G. et al., 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms RID C-4298-2011 RID C-2737-2011 RID C-3697-2011. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81, pp.509–520.

Kroll R.G., 1990. Alkalophiles. In: Edwards C (ed). *Microbiology of extreme environments*. Open University Press, Milton Keynes, pp 55–92

Kucey, R. M. N., & Paul, E. A. (1982). Carbon flow, photosynthesis, and N₂ fixation in mycorrhizal and nodulated faba beans (*Vicia faba* L.). *Soil biology and biochemistry*, 14(4), 407-412.

Kusari, S., Hertweck, C. & Spiteller, M., 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chemistry and Biology*, 19(7), pp.792–798. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>.

Lamoureaux, S.L. & Bourdôt, G.W., 2007. A review of the ecology and management of *Ranunculus acris* subsp. *acris* in pasture. *Weed Research*, 47(6), pp.461–471.

Langworthy, T.A., 1978. Microbial life in extreme pH values. In: *Microbial Life in Extreme Environments* (D. J. KUSHNER, Editor), pp. 279-315. Academic Press, London.

Lara, B., & Gandini, M. (2016). Caracterización del comportamiento fenológico de las coberturas vegetales en un sector de la Pampa Deprimida (Argentina): una aproximación utilizando series temporales de NDVI Characterization of land surface phenology of land cover types on the Flooding Pampa (Argentina): an approach using NDVI time series. *Ambiência*, 12(4), 765-783

Lam, C. K., Belanger, F. C., White Jr, J. F., & Daie, J. (1995). Invertase activity in *Epichloë/Acremonium* fungal endophytes and its possible role in choke disease. *Mycological Research*, 99(7), 867-873.

Lauber, C.L. et al., 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), pp.2407–2415.

Lavado, R.S. & Taboada, M. a., 1988. Water, salt and sodium dynamics in a Natraquoll in Argentina. *Catena*, 15(6), pp.577–594.

Lee, S.H., Ka, J.O. & Cho, J.C., 2008. Members of the phylum Acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Letters*, 285(2), pp.263–269.

Leitão, A. L., & Enguita, F. J. (2016). Gibberellins in *Penicillium* strains: challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. *Microbiological research*, 183, 8-18.

Legendre, P. & Gallagher, E.D., 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129(2), pp.271–280.

Lemanceau, P., & Alabouvette, C. (1993). Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. *Biocontrol Science and Technology*, 3(3), 219-234

León, R. J. C., Movia, C., & Valencia, R. J. (1975). Relación entre unidades de paisaje, suelo y vegetación en un área de la región Castelli-Pila. *Monografías, CIC, La Plata*, 5, 110-132.

Lewis, D. H., & Smith, D. C. (1967). Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. *New Phytologist*, 66(2), 143-184.

Lewis, N. G., & Yamamoto, E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual review of plant biology*, 41(1), 455-496.

Li, Z. et al., 2017. Metabolic pathways regulated by abscisic acid, salicylic acid and γ -aminobutyric acid in association with improved drought tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Physiologia Plantarum*, 159(1), pp.42–58.

Lievens, B., Rep, M., & Thomma, B. P. (2008). Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest management science*, 64(8), 781-788.

Liesak, W. et al., 1992. Occurrence of novel groups of the domains Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J Bacteriol*, 174(15), pp.5072–5078. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629164>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629164> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC206323> <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=1629164&retmode=ref&cmd=prlinks>.

Liesack, W. E. R. N. E. R., & Stackebrandt, E. R. K. O. (1992). Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *Journal of bacteriology*, 174(15), 5072-5078.

Lindsay, M.R. et al., 2001. Cell compartmentalisation in planctomycetes: Novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Archives of Microbiology*, 175(6), pp.413–429.

Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, 1(1), 387.

Llobet, M. et al., 2012. Above- and below-ground interactions between *Lotus tenuis* and *Cynodon dactylon* under different fertilization levels. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(1), pp.45–53. Available at: <http://pubs.aic.ca/doi/abs/10.4141/cjps2010-002>.

Lozupone, C. et al., 2011. UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison. *ISME Journal*, 5(2), pp.169–172. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2010.133>.

Lunn, M., Sloan, W.T. & Curtis, T.P., 2004. Estimating bacterial diversity from clone libraries with flat rank abundance distributions. *Environmental Microbiology*, 6(10), pp.1081–1085.

Macia-Vicente, J.G. et al., 2008. Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1), pp.90–105.

Maciá-Vicente, J. G., Ferraro, V., Burruano, S., & Lopez-Llorca, L. V. (2012). Fungal assemblages associated with roots of halophytic and non-halophytic plant species vary differentially along a salinity gradient. *Microbial ecology*, 64(3), 668-679.

McCormick, J. I., Hayes, R. C., Li, G. D., & Norton, M. R. (2014). A review of pasture establishment by undersowing with special reference to the mixed farming zone of south-eastern Australia. *Crop and Pasture Science*, 65(10), 956-972.

Maccheroni Jr, W., & Azevedo, J. L. (1998). Synthesis and secretion of phosphatases by endophytic isolates of *Colletotrichum musae* grown under conditions of nutritional starvation. *The Journal of general and applied microbiology*, 44(6), 381-387.

Magan, N., 1997. Fungi in extreme environments. *The mycota*, vol. 4, p. 99-113.

Malinowski, D. P., Alloush, G. A., & Belesky, D. P. (1998). Evidence for chemical changes on the root surface of tall fescue in response to infection with the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*. *Plant and Soil*, 205(1), 1-12.

Mamet, S. D., Lamb, E. G., Piper, C. L., Winsley, T., & Siciliano, S. D. (2017). Archaea and bacteria mediate the effects of native species root loss on fungi during plant invasion. *The ISME journal*, 11(5), 1261.

Marschner, B. et al., 2008. How relevant is recalcitrance for the stabilization of organic matter in soils ? §. , 1090, pp.91–110.

Marschner, P. et al., 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(11), pp.1437–1445.

Mathews, C., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2003). *Bioquímica*. 3 ra edición. Editorial Addison Wesley.

Marulanda, A., Barea, J. M., & Azcón, R. (2009). Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(2), 115-124.

Matias, S. R., Pagano, M. C., Muzzi, F. C., Oliveira, C. A., Carneiro, A. A., Horta, S. N., & Scotti, M. R. (2009). Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. *European Journal of Soil Biology*, 45(3), 259-266.

Mccormick, J.I. et al., 2014. A review of pasture establishment by undersowing with special reference to the mixed farming zone of south-eastern Australia. *Crop and Pasture Science*, 65(10), pp.956–972.

McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., ... & Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME journal*, 6(3), 610.

Mendoza, R., Escudero, V., & García, I. (2005). Plant growth, nutrient acquisition and mycorrhizal symbioses of a waterlogging tolerant legume (*Lotus glaber* Mill.) in a saline-sodic soil. *Plant and soil*, 275(1-2), 305-315.

- Mesterhazy, A., Bartok, T., & Lamper, C. (2003). Influence of wheat cultivar, species of *Fusarium*, and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of *Fusarium* head blight. *Plant Disease*, 87(9), 1107-1115.
- Mesterházy, Á., Lemmens, M., & Reid, L. M. (2012). Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize—a review. *Plant Breeding*, 131(1), 1-19
- Micallef, B. J., & Shelp, B. J. (1989). Arginine metabolism in developing soybean cotyledons: I. Relationship to nitrogen nutrition. *Plant physiology*, 90(2), 624-630.
- Morais, P. V, 2018. Impact of chromium-contaminated wastewaters on the microbial community of a river. , 54(January), pp.35–46.
- Morgan, J. M. (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual review of plant physiology*, 35(1), 299-319.
- Mortimer, P. E., Pérez-Fernández, M. A., & Valentine, A. J. (2008). The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(5), 1019-1027.
- Munkvold, G. P., McGee, D. C., & Carlton, W. M. (1997). Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 87(2), 209-217.
- Müller, C. B., & Krauss, J. (2005). Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 450-456.
- Nagai, K., Suzuc, K., Okada, G.;, 1998. Studies on the distribution of alkalophilic and alkali-tolerant soil fungi II: Fungal flora in two limestone caves in Japan. *Mycoscience*, vol. 39, no 3, p. 293-298.
- Nagai, Koji, et al., 1995. Studies on the distribution of alkalophilic and alkali-tolerant soil fungi I. *Mycoscience*, vol. 36, no 3, p. 247-256.
- Naik, B. S., Shashikala, J., & Krishnamurthy, Y. L. (2009). Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. *Microbiological Research*, 164(3), 290-296.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.

Newsham, K. K., Fitter, A. H., & Watkinson, A. R. (1995). Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(10), 407-411.

Nieva, A.S. et al., 2016. Herbicide-mediated promotion of *Lotus tenuis* (Waldst. & Kit. ex Wild.) did not influence soil bacterial communities, in soils of the Flooding Pampa, Argentina. *Applied Soil Ecology*, 98, pp.83–91. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.09.011>.

Noiraud, N., Maurousset, L. & Lemoine, R., 2001. Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(9), pp.717–728.

Norkrans, B., 1966. Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archiv für Mikrobiologie*, vol. 54, no 4, p. 374-392.

Obledo, E. N., Barragán-Barragán, L. B., Gutiérrez-González, P., Ramírez-Hernández, B. C., Ramírez, J. J., & Rodríguez-Garay, B. (2003). Increased photosynthetic efficiency generated by fungal symbiosis in *Agave victoria-reginae*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 74(3), 237-241.

Obuekwe, C. O., Badrudeen, A. M., Al-Saleh, E., & Mulder, J. L. (2005). Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. *International biodeterioration & biodegradation*, 56(4), 197-205.

Ochsenreiter, T., Pfeifer, F. & Schleper, C., 2002. Diversity of Archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles*, 6(4), pp.267–274.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., ... & Wagner, H. (2012). *Vegan: community Ecology Package*. R Package 2.0. 3. CRAN. R-project.org/package=vegan.

Olsen, G. J., Overbeek, R., Larsen, N., Marsh, T. L., McCaughey, M. J., Maciukenas, M. A., ... & Woese, C. R. (1992). The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research*, 20(suppl), 2199-2200.

Orgiazzi, A. et al., 2013. 454 Pyrosequencing Analysis of Fungal Assemblages From Geographically Distant, Disparate Soils Reveals Spatial Patterning and a Core Mycobiome. *Diversity*, 5(1), pp.73–98.

Obuekwe, C. O., Badrudeen, A. M., Al-Saleh, E., & Mulder, J. L. (2005). Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. *International biodeterioration & biodegradation*, 56(4), 197-205.

Pacovsky, R. S. (1988). Influence of inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Glomus fasciculatum* on sorghum nutrition. *Plant and Soil*, 110(2), 283-287.

Pang, J. et al., 2010. Variation in morphological and physiological parameters in herbaceous perennial legumes in response to phosphorus supply. *Plant and Soil*, 331(1), pp.241–255.

Pang, P. C., & Paul, E. A. (1980). Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on ¹⁴C and ¹⁵N distribution in nodulated fababeans. *Canadian Journal of Soil Science*, 60(2), 241-250.

Papritz, A., & Flühler, H. (1994). Temporal change of spatially autocorrelated soil properties: optimal estimation by cokriging. *Geoderma*, 62(1-3), 29-43.

Penton, C.R. et al., 2013. Fungal diversity in permafrost and tallgrass prairie soils under experimental warming conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(22), pp.7063–7072.

Perelman, S. B. (1996). *Analisis multivariado descriptivo aplicado al estudio de las comunidades de pastizal de la Pampa Deprimida* (Doctoral dissertation, Thesis. Escuela para Graduados, Facultad de Agronomía UBA, Buenos Aires, Argentina).

Perelman, S. B., León, R. J. C., & Oesterheld, M. (2001). Cross-scale vegetation patterns of Flooding Pampa grasslands. *Journal of Ecology*, 89(4), 562-577.

Perry, J. A., Wang, T. L., Welham, T. J., Gardner, S., Pike, J. M., Yoshida, S., & Parniske, M. (2003). A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 131(3), 866-871.

Perucci, P., Vischetti, C. & Battistoni, F., 1999. Rimsulfuron in a silty clay loam soil: Effects upon microbiological and biochemical properties under varying microcosm conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(2), pp.195–204.

Petrini, O., & Fisher, P. J. (1986). Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. *Transactions of the British Mycological Society*, 87(4), 647-651

Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A., & Versalovic, J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical chemistry*, 55(5), 856-866.

Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.

Pose-Juan, E., Igual, J. M., Sánchez-Martín, M. J., & Rodríguez-Cruz, M. S. (2017). Influence of Herbicide Triasulfuron on Soil Microbial Community in an Unamended Soil and a Soil Amended with Organic Residues. *Frontiers in microbiology*, 8, 378.

Prodgers, R. A., & Inskeep, W. P. (1991). Heavy metal tolerance of inland saltgrass (*Distichlis spicata*). *The Great Basin Naturalist*, 271-278.

Prosser, J. I., Bohannan, B. J., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., ... & Osborn, A. M. (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 384.

Purdy, K.J. et al., 2010. Systems biology for ecology. From molecules to ecosystems. *Advances in Ecological Research*, 43(C), pp.87–149.

Rascovan, N., Carbonetto, B., Revale, S., Reinert, M. D., Alvarez, R., Godeas, A. M., ... & Zelada, A. M. (2013). The PAMPA datasets: a metagenomic survey of microbial communities in Argentinean pampean soils. *Microbiome*, 1(1), 21.

Qin, Y., Pan, X., Kubicek, C., Druzhinina, I., Chenthamara, K., Labbé, J. L., & Yuan, Z. (2017). Diverse plant-associated pleosporalean fungi from saline areas: ecological tolerance and nitrogen-status dependent effects on plant growth. *Frontiers in microbiology*, 8, 158

Radhakrishnan, R., Khan, A. L., Kang, S. M., & Lee, I. J. (2015). A comparative study of phosphate solubilization and the host plant growth promotion ability of *Fusarium*

verticillioides RK01 and Humicola sp. KNU01 under salt stress. *Annals of microbiology*, 65(1), 585-593.

Rajapaksha, R. M. C. P. (2011). Heavy metal tolerance of culturable bacteria and fungi in a long-term cultivated tropical ultisol. *European journal of soil biology*, 47(1), 9-15.

Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 369-394

Rasmussen, J.B., Hammerschmidt, R. & Zook, M.N., 1991. Systemic Induction of Salicylic Acid Accumulation in Cucumber after Inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology*, 97(4), pp.1342–1347.

Redman, R. S., Kim, Y. O., Woodward, C. J., Greer, C., Espino, L., Doty, S. L., & Rodriguez, R. J. (2011). Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change. *PLOS one*, 6(7), e14823

Rodriguez RJ, White JF Jr, Arnold AE, R.R., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol*, (182), pp.314–330.

Rodriguez, R.J., Redman, R.S. & Henson, J.M., 2003. Plants To High Stress Environments. , pp.261–272.

Rodriguez, A. M., & Jacobo, E. J. (2010). Glyphosate effects on floristic composition and species diversity in the Flooding Pampa grassland (Argentina). *Agriculture, ecosystems & environment*, 138(3-4), 222-231.

Ribaudo, C. M., Krumholz, E. M., Cassán, F. D., Bottini, R., Cantore, M. L., & Curá, J. A. (2006). *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(2), 175-185

Richardson, M. D., Chapman, G. W., Hoveland, C. S., & Bacon, C. W. (1992). Sugar alcohols in endophyte-infected tall fescue under drought. *Crop science*, 32(4), 1060-1061.

Richardson, A.E. & Hadobas, P.A., 1997. Soil isolates of *Pseudomonas* spp . that utilize inositol phosphates. , 516, pp.509–516.

Roitsch, T., Source-sink regulation. , pp.198–206.

Rothschild, L.J. & Mancinelli, R.L., 2001. Life in extreme environments (nature).PDF. Nature, 409(6823), pp.1092–1101. Available at: <http://www.nss.org/adastra/volume14/rothschild.html>.

Rousk, J. et al., 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. ISME Journal, 4(10), pp.1340–1351.

Sahay, N. S., & Varma, A. (1999). Piriformospora indica: a new biological hardening tool for micropropagated plants. FEMS Microbiology letters, 181(2), 297-302

Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 29(1), 319-343. Rilling, M. S. PD (2002). Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification. Soil Biology and Biochemistry, 34, 1371-1374.

Sait, M., Davis, K.E.R. & Janssen, P.H., 2006. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. Applied and Environmental Microbiology, 72(3), pp.1852–1857.

Sala, O. E., Oesterheld, M., León, R. J. C., & Soriano, A. N. D. A. (1986). Grazing effects upon plant community structure in subhumid grasslands of Argentina. *Vegetatio*, 67(1), 27-32.

Sala, O. E. (1988). The effect of herbivory on vegetation structure. *Plant form and vegetation structure*, 317-330.

Sanaullah, M. et al., 2016. How do microbial communities in top- and subsoil respond to root litter addition under field conditions? Soil Biology and Biochemistry, 103, pp.28–38. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.017>.

Sanger, F. & Coulson, A.R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. Journal of Molecular Biology, 94(3), pp.441–448. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022283675902132>.

Sangwan, P. et al., 2005. Detection and cultivation of soil verrucomicrobia. Applied and Environmental Microbiology, 71(12), pp.8402–8410.

- Sannazzaro, A. I., Ruiz, O. A., Albertó, E., & Menéndez, A. B. (2004). Presence of different arbuscular mycorrhizal infection patterns in roots of *Lotus glaber* plants growing in the Salado River basin. *Mycorrhiza*, 14(2), 139-142.
- Sannazzaro, A.I. et al., 2006. Alleviation of salt stress in *Lotus glaber* by *Glomus intraradices*. *Plant and Soil*, 285(1–2), pp.279–287.
- Santini, T.C., Warren, L.A. & Kendra, K.E., 2015. Microbial diversity in engineered haloalkaline environments shaped by shared geochemical drivers observed in natural analogues. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), pp.5026–5036.
- Sato, S., & Tabata, S. (2006). *Lotus japonicus* as a platform for legume research. *Current opinion in plant biology*, 9(2), 128-132.
- Savé, R., Biel, C., & De Herralde, F. (2000). Leaf pubescence, water relations and chlorophyll fluorescence in two subspecies of *Lotus creticus* L. *Biologia Plantarum*, 43(2), 239-244.
- Schlöter, M., Dilly, O., & Munch, J. C. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 98(1-3), 255-262
- Schoch, C.L. et al., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), pp.1–6.
- Schreiber, U. (2004). Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In *Chlorophyll a Fluorescence* (pp. 279-319). Springer Netherlands.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(6), 661-686.
- Schulz, B., Römmer, A. K., Dammann, U., Aust, H. J., & Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. *Mycological Research*, 103(10), 1275-1283.
- Selosse, M. A., & Schardl, C. L. (2007). Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist*, 173(3), 452-458.

Seki, M. et al., 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), pp.296–302.

Selvakumar, G., Kim, K., Shagol, C. C., Joe, M. M., & Sa, T. (2017). Spore associated bacteria of arbuscular mycorrhizal fungi improve maize tolerance to salinity by reducing ethylene stress level. *Plant Growth Regulation*, 81(1), 159-165.

Senechkin, I. V. et al., 2010. Isolation and Partial Characterization of Bacterial Strains on Low Organic Carbon Medium from Soils Fertilized with Different Organic Amendments. *Microbial Ecology*, 60(4), pp.829–839.

Shade, A. & Handelsman, J., 2012. Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology*, 14(1), pp.4–12.

Shayne, J. J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C., and Janssen, H.P., 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), pp.7211–7214.

Sheen, J., Zhou, L. & Jang, J.C., 1999. Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(5), pp.410–418.

Shelp, B.J., Bown, A.W. & McLean, M.D., 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science*, 4(11), pp.446–452.

Shweta, S., Zuehlke, S., Ramesha, B. T., Priti, V., Kumar, P. M., Ravikanth, G., ... & Shaanker, R. U. (2010). Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry*, 71(1), 117-122.

Sieber, T., Riesen, T. K., Müller, E., & Fried, P. M. (1988). Endophytic Fungi in Four Winter Wheat Cultivars (*Triticum aestivum* L.) Differing in Resistance Against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. & Germ.= *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. *Journal of phytopathology*, 122(4), 289-306

Sieber, T.N. & Grünig, C.R., 2006. Biodiversity of Fungal Root-Endophyte Communities and Populations, in Particular of the Dark Septate Endophyte. , 9.

Sieber, T., Riesen, T. K., Müller, E., & Fried, P. M. (1988). Endophytic Fungi in Four Winter Wheat Cultivars (*Triticum aestivum* L.) Differing in Resistance Against *Stagonospora*

nodorum (Berk.) Cast. & Germ.= *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. *Journal of phytopathology*, 122(4), 289-306.

Sierra, E. M., & Montecinos, E. R. (1990). Cronología de inundaciones y sequías en la Depresión del Salado. *Rev. Fac. Agron*, 11, 35-45.

Singh, H., & Reddy, M. S. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology*, 47(1), 30-34.

Soriano, A., León, R. J. C., Sala, O. E., Lavado, R. S., Deregibus, V. A., Cauhepe, M. A., ... & Lemcoff, J. H. (1991). Río de la Plata Grasslands. In 'Ecosystems of the world 8A. Natural grasslands. Introduction and Western Hemisphere'.(Ed. RT Coupland) pp. 367–407.

Spiering, M. J., Greer, D. H., & Schmid, J. A. N. (2006). Effects of the fungal endophyte, *Neotyphodium lolii*, on net photosynthesis and growth rates of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) are independent of in planta endophyte concentration. *Annals of botany*, 98(2), 379-387.

Steiman, R., Ford, L., Ducros, V., Lafond, J. L., & Guiraud, P. (2004). First survey of fungi in hypersaline soil and water of Mono Lake area (California). *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(1), 69-83.

Stockinger, H., Krüger, M., & Schüßler, A. (2010). DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 187(2), 461-474.

Stoutjesdijk, P. A., Sale, P. W., & Larkin, P. J. (2001). Possible involvement of condensed tannins in aluminium tolerance of *Lotus pedunculatus*. *Functional Plant Biology*, 28(11), 1063-1074

Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Photosynthesis: carbon reactions. *Plant Physiology*,

Tayung, K., Barik, B. P., Jha, D. K., & Deka, D. C. (2011). Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. *Mycosphere*, 2(3), 203-213

Tedersoo, L. et al., 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346(6213), pp.1256688–1256688. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1256688>.

Tenenboim, H., & Brotman, Y. (2016). Omic relief for the biotically stressed: metabolomics of plant biotic interactions. *Trends in plant science*, 21(9), 781-791.

Tetlow, I. J., Morell, M. K., & Emes, M. J. (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of experimental botany*, 55(406), 2131-2145.

Tenenboim, H., & Brotman, Y. (2016). Omic relief for the biotically stressed: metabolomics of plant biotic interactions. *Trends in plant science*, 21(9), 781-791.

Thom, E.R., Wildermoth, D.D. & Taylor, M.J., 1993. Growth and persistence of perennial ryegrass and white clover direct-drilled into a paspalum-dominant dairy pasture treated with glyphosate. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 36(July), pp.197–207.

Tian, X. L., Wu, X. L., Zhang, S. Q., & Lou, C. H. (2002). Functions of gamma-aminobutyric acid in higher plant responses to stress. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 14(4), 215-219.

Toby Kiers, E., Palmer, T. M., Ives, A. R., Bruno, J. F., & Bronstein, J. L. (2010). Mutualisms in a changing world: an evolutionary perspective. *Ecology letters*, 13(12), 1459-1474. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189(1), pp.304–308.

Torsvik, V. et al., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria . High Diversity in DNA of Soil Bacteria. , 56(3), pp.782–787.

Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5(3), 240-245.

Trapero Casas, A., & Jiménez Díaz, R. M. (1985). Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain-.

Tresner, H. D., & Hayes, J. A. (1971). Sodium chloride tolerance of terrestrial fungi. *Applied Microbiology*, 22(2), 210-213.

- Tricart, J. (1973). *Geomorfología de la Pampa Deprimida: base para los estudios edafológicos y agronómicos* (No. 551.45 631.478212). Secretaría de Estado de Agricultura y Ganadería de la Nación, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria,
- Udvardi, M. K., Tabata, S., Parniske, M., & Stougaard, J. (2005). Lotus japonicus: legume research in the fast lane. *Trends in plant science*, 10(5), 222-228.
- Van der Putten, W. H. (2003). Plant defense belowground and spatiotemporal processes in natural vegetation. *Ecology*, 84(9), 2269-2280
- Van Kooten, O., & Snel, J. F. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis research*, 25(3), 147-150
- Vervoorst, F. B. (1967). Las Comunidades vegetales de la depresión del Salado: Provincia de Buenos Aires.
- Viglizzo, E. F., Lértora, F., Pordomingo, A. J., Bernardos, J. N., Roberto, Z. E., & Del Valle, H. (2001). Ecological lessons and applications from one century of low external-input farming in the pampas of Argentina. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 83(1-2), 65-81.
- Vignolio, O. R., Biel, C., de Herralde, F., Araújo-Alves, J. P., & Savé, R. (2005, January). Use of water-stress tolerant Lotus creticus and Cynodon dactylon in soil revegetation on different slopes in a Mediterranean climate. In *Annales Botanici Fennici* (pp. 195-205). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- USDA, N. (1998). Keys to soil taxonomy. *USDA, Washington DC Google Scholar*.
- Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., & Lee, I. J. (2012). Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules*, 17(9), 10754-10773.
- Walkley, A. & Black, I.A., 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1), pp.29–38.
- Waller, F., Frank, et al., 2005. The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, vol. 102, no 38, p. 13386-13391.

Wang, J.T. et al., 2015. Soil pH determines the alpha diversity but not beta diversity of soil fungal community along altitude in a typical Tibetan forest ecosystem. *Journal of Soils and Sediments*, 15(5), pp.1224–1232.

Ward, N.L. et al., 2009. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), pp.2046–2056.

Ward, N. Et al. I. The order planctomycetales, including the genera planctomyces, pirellula, gemmata and Isosphaera and the candidatus genera brocadia, kuenenia and scalindua. En *The prokaryotes*. Springer New York, 2006. p. 757-793.

Wardle, D.A. & Parkinson, D., 1990. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant and Soil*, 122(1), pp.21–28.

Warren, H. L., & Kommedahl, T. (1973). Fertilization and wheat refuse effects on *Fusarium* species associated with wheat roots in Minnesota. *Phytopathology*.

West, C. P., Oosterhuis, D. M., & Wulschleger, S. D. (1990). Osmotic adjustment in tissues of tall fescue in response to water deficit. *Environmental and experimental botany*, 30(2), 149-156.

Wheeler, D. M., Edmeades, D. C., Christie, R. A., & Gardner, R. (1992). Effect of aluminium on the growth of 34 plant species: a summary of results obtained in low ionic strength solution culture. *Plant and Soil*, 146(1-2), 61-66.

Williamson, J., 2002. Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols—multifunctional plant protection? *Journal of the ...*, 127(4), pp.467–473. Available at: <http://journal.ashspublications.org/content/127/4/467.abstract>.

Wilson, D., 1995. Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, 73(2), p.274. Available at: <http://www.jstor.org/stable/3545919?origin=crossref>.

Wojciechowski, M. F. (2003). Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. *Advances in legume systematics, part, 10*, 5-35

Wright, D. P., Read, D. J., & Scholes, J. D. (1998). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment*, 21(9), 881-891.

Xu, X., Thornton, P.E. & Post, W.M., 2013. R E S E A R C H P A P E R A global analysis of soil microbial biomass carbon , nitrogen and phosphorus in terrestrial ecosystems. , pp.737–749.

Yates, I.E., Bacon, C.W. & Hinton, D.M., 1997. Effects of Endophytic Infection by *Fusarium moniliforme* on Corn Growth and Cellular Morphology. *Plant Disease*, 81(7), pp.723–728. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.1997.81.7.723>.

Yin, X., & van Laar, H. H. (2005). *Crop System Dynamics. An ecophysiological simulation model for genotype-by-environment interactions*. The Neatherland: Wageningen Academic Publishers, 155s. ISBN, 487063966.

You, Y. H., Park, J. M., Lim, S. H., Kang, S. M., Park, J. H., Lee, I. J., & Kim, J. G. (2016). Gibberellin A7 production by *Aspergillus tubingensis* YH103 and cultural characteristics of endophytic fungi isolated from *Tetragonia tetragonoides* in Dokdo islands. *The Korean Journal of Microbiology*, 52(1), 32-39.

Zabala, G., Zou, J., Tuteja, J., Gonzalez, D. O., Clough, S. J., & Vodkin, L. O. (2006). Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonas syringae* infection. *BMC Plant Biology*, 6(1), 26.

Zhang, L. & Xu, Z., 2008. Assessing bacterial diversity in soil : AAAA brief review. *Journal of Soils and Sediments*, 8(6), pp.379–388.

Zhang, T., Shao, M.F. & Ye, L., 2012. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME Journal*, 6(6), pp.1137–1147. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.188>.

Zhang, T. et al., 2016. Soil pH is a Key Determinant of Soil Fungal Community Composition in the Ny-Ålesund Region , Svalbard (High Arctic). , 7(February), pp.1–10.

Zhou, J., Jiang, X., Zhou, B., Zhao, B., Ma, M., Guan, D., ... & Qin, J. (2016). Thirty four years of nitrogen fertilization decreases fungal diversity and alters fungal community composition in black soil in northeast China. *Soil Biology and Biochemistry*, 95, 135-143.

Zimmermann, J. et al., 2005. Detection and phylogenetic relationships of highly diverse uncultured acidobacterial communities in Altamira Cave using 23S rRNA sequence analyses. *Geomicrobiology Journal*, 22(7–8), pp.379–388.

Živcák, M., Brestic, M., Olšovská, K., & Slamka, P. (2008). Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant Soil Environ*, 54(4), 133–139.

Zul, D. et al., 2007. Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: Implications for the determinants of bacterial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), pp.6916–6929.